



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

REC'D 02 MAR 2004

WIPO : PCT

CERTIFICADO OFICIAL

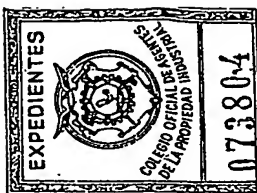
Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE ADICIONAL número 200302671, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 17 de Noviembre de 2003.

Madrid, 16 de Febrero de 2004

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.
P.D.

CARMEN LENCE REIJA

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



17 NOV. 2003

Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD
P200302671

1) MODALIDAD

☒ PATENTE DE INVENCION☐ MODELO DE UTILIDAD

2) TIPO DE SOLICITUD:

☒ ADICIÓN A LA PATENTE☐ SOLICITUD PROVISIONAL☐ CAMBIO DE MODALIDAD☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN

MODALIDAD Patente Invención

N.º SOLICITUD P200300206

FECHA SOLICITUD 28.01.2003

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

05 NOV 17 11:20

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

MADRID

CÓDIGO

218

5) SOLICITANTES: APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

EFARMES, S.A.

NOMBRE

NACIONALIDAD
ESPAÑOLACÓDIGO PAÍS
ES

DNI/CIF

CNAE

PYME

6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SARDENYA, 350

LOCALIDAD Barcelona

PROVINCIA

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO

FAX

CORREO ELECTRÓNICO

CÓDIGO POSTAL

08025

CÓDIGO PAÍS

ES

CÓDIGO PAÍS

ES

7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO

- 1- MATA LÓPEZ
- 2- ALONSO KARLEZI
- 3- MOZAS ALONSO
- 4- REYES LEAL

PEDRO
RODRIGO ALBERTO
PILAR
GILBERTO

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

ES
ES
ES
ES

8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O EL ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☐ INVENC. LABORAL☒ CONTRATO☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

"PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GÉNICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR"

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI ☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/1986 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.L., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

IGNACIO DIEZ DE RIVERA ELZABURU (891(5)) Colegiado número 585

Miguel Ángel 21 28010 - Madrid España

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN N.º DE PÁGINAS: 45☒ N.º DE REIVINDICACIONES: 16☐ DIBUJOS. N.º DE PÁGINAS:☒ LISTA DE SECUENCIAS N.º DE PÁGINAS: 106☒ RESUMEN☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD☒ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD☒ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN☒ OTROS: DISQUETE Y DOCUMENTO CESION

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

IGNACIO DIEZ DE RIVERA ELZABURU
por mi compañero

(VER COMUNICACIÓN AL DORSO)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art.81 del R.D. 2245/1986.



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

P200302671

FECHA DE PRESENTACIÓN

17 NOV. 2003

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:	APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNI/CIF	CNAE	PYME

(7) INVENTORES:	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
5)	POCOVÍ MIERAS	MIGUEL	ESPAÑOLA
6)	CASTILLO FERNÁNDEZ	SERGIO	ESPAÑOLA
7)	TEJEDOR HERNÁNDEZ	DIEGO	ESPAÑOLA
8)	MARTÍNEZ MARTÍNEZ	ANTONIO	ESPAÑOLA
9)	MALLEN PÉREZ	MIGUEL	ESPAÑOLA

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR	FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA
PAÍS DE ORIGEN			

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200302671

FECHA DE PRESENTACIÓN

17 NOV. 2003

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Procedimiento y dispositivo de detección de mutaciones en secuencias genicas aisladas del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) asociado con la hipercolesterolemia familiar. La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la presencia o ausencia de veintinueve mutaciones causantes de hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de un individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores complementarios al gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad, el análisis del producto amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "blochip" en el que se depositan sondas de oligonucleótidos que permite detectar estas veintinueve mutaciones en el ADN.

GRÁFICO



12

SOLICITUD DE ADICIÓN A LA PATENTE

(21)	NÚMERO DE SOLICITUD
P200302671	
(22)	FECHA DE PRESENTACIÓN
17 NOV. 2003	
(61)	PATENTE PRINCIPAL
200300206	

(31) NÚMERO		DATOS DE PRIORIDAD		(32) FECHA	(33) PAÍS
(71) SOLICITANTE (S)					
EFARMES, S.A.					
DOMICILIO SARDENYA, 350, 08025 Barce-					
lona, España NACIONALIDAD española					
(72) INVENTOR (ES) PEDRO MATA LÓPEZ, RODRIGO ALBERTO ALONSO KARLEZI, PILAR MOZAS ALONSO, GILBERTO REYES LEAL, MIGUEL POCOVÍ MIERAS, SERGIO CASTILLO FERNÁNDEZ, DIEGO (X)					
(51) Int. Cl.			GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)		
(54) TÍTULO DE LA INVENCION					
PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCION DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GENICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR					
(57) RESUMEN					
<p>Procedimiento y dispositivo de detección de mutaciones en secuencias genicas aisladas del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) asociado con la hipercolesterolemia familiar. La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la presencia o ausencia de veintinueve mutaciones causantes de hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de un individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores complementarios al gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad, el análisis del producto amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "blochip" en el que se depositan sondas de oligonucleótidos que permite detectar estas veintinueve mutaciones en el ADN.</p>					
(X) TEJEDOR HERNÁNDEZ, ANTONIO MARTÍNEZ MARTÍNEZ Y MIGUEL MALLEN PÉREZ					

**CERTIFICADO DE ADICION A LA PATENTE 200300206 PARA UN:
PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN
SECUENCIAS GÉNICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS
DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.**

5

Ambito de la invención

La invención se adscribe al sector técnico-industrial del diagnóstico in vitro, extracorpóreo, de muestras biológicas, mediante técnicas de ingeniería genética, para
10 determinar la predisposición de un individuo al desarrollo de la enfermedad denominada hipercolesterolemia familiar.

Antecedentes de la invención

La aterosclerosis se define según la Organización Mundial de la Salud (OMS)
15 como una combinación de cambios que se produce en la íntima de las arterias a consecuencia de un acúmulo focal de lípidos y componentes complejos que se acompaña con la formación de tejido fibroso y calcificación que a su vez se asocia con cambios en estructura de la media.

La aterosclerosis puede considerarse como una forma especial de arteriosclerosis
20 con un depósito patogénico de lípidos en la pared arterial. La mayoría de formas de la arteriosclerosis implican la degeneración grasa de la pared vascular, con lo que el término arteriosclerosis y aterosclerosis suele utilizarse de forma indistinta (Assmann G. in "Lipid Metabolism and Atherosclerosis" Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart 1982:1).

Los lípidos son sustancias insolubles en disoluciones acuosas. Las lipoproteínas
25 son las partículas que posibilitan el transporte de los lípidos en la sangre. Las lipoproteínas se dividen en varias categorías según su densidad dependiendo de como pueden separarse por ultracentrifugación. (Havel RJ y col. J Clin Invest 1955, 34:1345). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ($d=1.019-1.063$ g/mL) son las que mayoritariamente transportan el colesterol en el torrente circulatorio. Estas lipoproteínas
30 están formadas por el 75% de lípidos (principalmente colesterol libre, colesterol esterificado y fosfolípidos), alrededor el 70 % del colesterol total de la sangre es transportado por las partículas LDL.

El término hipercolesterolemia se utiliza para reflejar la elevación del colesterol del plasma por encima de los niveles considerados normales para una determinada población y es uno de los factores cruciales para el inicio y progresión de la arteriosclerosis. Más de la mitad de todas las muertes que se producen en los países desarrollados están relacionados con la enfermedad cardiovascular arteriosclerosa (Murray CJL y Lopez AD. Lancet 1997; 349:1269-1276).

Las hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por mutaciones que se producen en el gen del receptor de las LDL (r-LDL), este gen codifica una proteína que permite la captación y degradación intracelular de las LDL (Goldstein JL, y Brown MS Ann Rev Cell Biol 1985; 1:1-39).

La penetrancia de la HF es cercana al 100% lo que significa que la mitad de la descendencia de una persona afectada tendrá su colesterol plasmático muy elevado desde el momento de nacer, afectando por igual a hombres y mujeres (Goldstein JL, Brown MS. The metabolic basis of inherited disease. Editores: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. McGraw Hill New York 6th edition, 1989; 1215-1250).

Los pacientes con HF presentan como síntomas característicos clínicos arco corneal, xantomas tendinosos y enfermedad coronaria prematura (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). La HF es una de las enfermedades monogénicas mas frecuentes con una prevalencia estimada de pacientes heterocigotos de una en cada 500 personas y de heterocigotos de una en cada 1.000.000 .

Determinadas poblaciones tales como los canadienses de habla francesa (Leitersdorf E y col. J Clin Invest 1990; 85:1014-1023), cristianos libaneses (Lehrman MA y col. J Biol Chem 1987; 262:401-410), drusos (Landsberger D y col. Am J Hum Genet 1992; 50: 427-433) finlandeses (Koivisto UM y col. J Clin Invest 1992; 90:219-228), los "afrikaners" de Surafrica (Kotze MJ y col. Ann Hum Genet 1991; 55:115-121), los judíos Ashkenazi de descendencia lituana (Meiner V y col. Am J Hum Genet 1991; 49:443-449) presentan la particularidad que solo tienen unas pocas mutaciones responsables de la HF, esto es consecuencia de un efecto fundador y por lo tanto la frecuencia de heterocigotos en estas poblaciones es mas alta que lo estimado para otras poblaciones.

Los pacientes con HF presentan una concentración de colesterol en plasma muy elevada, por regla general superior al percentil 95. La mortalidad de los pacientes con HF, ajustada por edad y sexo, es entre cuatro y cinco veces mas alta que en la población general (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). Los pacientes que heredan dos mutaciones en el locus del gen del r-LDL se denominan HF homocigotos o HF heterocigotos compuestos en cuyo caso prácticamente no hay receptores funcionales lo que condiciona que la concentración de c-LDL se eleve entre seis y ocho veces en relación a la considerada normal. La mayoría de pacientes de esta categoría presentan enfermedad coronaria antes de los 20 años (Goldstein JL y col. N Engl J Med 1983; 309:288-296). Si los pacientes homocigotos o los heterocigotos fueran diagnosticados antes de que presentaran signos de enfermedad coronaria y tratados de forma preventiva su riesgo de infarto de miocardio se vería reducido de forma sustancial

El r-LDL es una glicoproteína ubicua de membrana de 839 aminoácidos que capta e internaliza partículas LDL por un mecanismo denominado de endocitosis (Goldstein J. y Brown M. J Biol Chem 1974; 249:5153-5162).

El gen del r-LDL se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 19 región p13.1-13.3 (Yamamoto T y col. Cell 1984;39: 27-38), tiene un tamaño de 45.000 pares de bases (pb). Este gen consta de 18 exones y 17 intrones los cuales codifican los seis dominios funcionales de la proteína: El péptido señal, el dominio de unión del ligando, el dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF), la zona de glicosilación, el dominio transmembrana y el citoplásmico (Sundhof T y col. Science 1985; 228:893-895).

La síntesis de r-LDL se encuentra regulada por un sofisticado mecanismo de retroalimentación que controla la transcripción del gen del r-LDL en función de las variaciones de la concentración intracelular de esteroides y la demanda celular de colesterol (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262:10773-10779). Las secuencias del ADN necesarias para la regulación de la transcripción del gen del r-LDL están situadas en una región de 177 pb de la zona promotora (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262: 10773-10779). Esta región contiene todos los elementos en cis que permiten la expresión basal así como la regulación por esteroides y contiene tres repeticiones de 16 pb cada una. La repetición 1 y 3 contienen un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 y son esenciales para que se produzca la expresión basal del gen pero requieren de la

- contribución de la repetición 2 para la expresión completa (Dawson PA y col. J Biol Chem 1988; 263:3372-3379). La repetición 2 incluye un elemento de regulación por esteroides de 10 pb, SRE-1 (Smith JR y col. J Biol Chem 1990; 265:2306-2310) que posibilita la unión del factor de transcripción denominado SREBP-1 el cual aumenta la transcripción cuando la concentración de esteroides intracelulares disminuye. Hasta la fecha, se han descrito varias mutaciones situadas en los elementos reguladores de la transcripción del receptor LDL (Hobbs HH, y col al. Hum Mutat 1992; 1:445-466; Koivisto UM. Y col Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91:10526-10530), Mozas P, y col J Lipid Res 2002; 43:13-18, <http://www.ucl.ac.uk/fh>; <http://www.umd.necker.fr>).
- El exón 1 codifica el péptido señal el cual consiste en una secuencia de 21 amino ácidos que es eliminado de la proteína durante la translocación que tiene lugar en el retículo endoplásmico. Se han descrito varias mutaciones en este exón que incluyen cambios de pauta de lectura, cambios de aminoácido o codones de parada (<http://www.ucl.ac.uk/fh>; <http://www.umd.necker.fr>).
- Los exones del 2 al 6 codifican el dominio de unión al ligando, el cual consta de siete repeticiones en tandem de 40 amino ácidos. La estructura de este dominio ha sido resuelta de forma parcial (Jeon H y col. Nature Struct Biol 2001; 8:499-5049). En cada repetición tiene una agrupación de aminoácidos cargados negativamente Asp-X-Ser-Asp-Glu y seis restos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro.
- El segundo dominio del r-LDL consta de una secuencia de 400 amino ácidos codificada por los exones 7 al 14. Esta secuencia tiene un 33% de homología con el factor precursor del crecimiento de la epidermis (EGFP). Al igual que el dominio de unión al ligando, esta región, contiene tres repeticiones de 40 amino ácidos con secuencias ricas en cisteína. Las dos primeras repeticiones, denominadas A y B, son contiguas y están separadas de la tercera repetición por una región de 280 amino ácidos que contiene cinco copias de la secuencia YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp). El dominio análogo al EGFP es fundamental para la disociación ácida del r-LDL de las partículas recubiertas de clatrina que tiene lugar en el endosoma durante el proceso de reciclado del receptor. De todas las mutaciones descritas hasta la fecha, aproximadamente el 55% están localizadas en la región homóloga EGFP y el 35% están localizadas en las repeticiones YWTD (<http://www.ucl.ac.uk/fh>).

El tercer dominio del r-LDL, codificado por el exón 15, es una región en la que abundan los amino ácidos treonina y serina. La función de este dominio se desconoce, pero se sabe que en esta región están anclados las cadenas de carbohidratos. Esta zona está muy poco conservada en seis especies analizadas y se cree que desempeña una función estabilizadora del receptor. (Goldstein y col. En *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Editores Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 7th Edition. McGraw Hill, 1995: 1981-2030).

El dominio transmembrana consta de 22 amino ácidos hidrofóbicos codificados por el exón 16 y el extremo 5' del exón 17. Este dominio es esencial para el anclaje del receptor a la membrana celular.

El dominio citoplásmico del r-LDL, está formado por una secuencia de 50 amino ácidos codificada por la región 3' del exón 17 y la 5' del exón 18. Este dominio contiene dos secuencias señal que permiten dirigir a la proteína a la superficie celular y situar al receptor en las partículas revestidas (Yokode M, y col. *J Cell Biol* 1992;117: 39-46). Este dominio es uno de los más conservados, con un porcentaje de aminoácidos conservados del 86% entre seis especies analizadas.

Las mutaciones del r-LDL que se han encontrado en pacientes con HF se clasifican en 5 clases: alelos nulos, defectuosos en el transporte, defectuosos en la unión, en la internalización y reciclado. Por regla general cada categoría está asociada con mutaciones localizadas en una región del gen que codifican un dominio particular de la proteína. (Hobbs HH, et al. *Hum Mutat* 1992; 1:445-466).

La heterogeneidad que presentan los pacientes con HF en cuanto a los niveles plasmáticos de colesterol ligado a LDL (C-LDL) y enfermedad coronaria se debe en parte a diferencias en cuanto al tipo de mutación (Sun XM y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1993; 13:1680-1688, Kotze y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1993; 13:1460-1468; Gudnason V y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997;17:3092-3101). Por otra parte, el descenso que se produce en la concentración del c-LDL en pacientes HF heterocigotos tras el tratamiento con inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa depende, en parte, de la naturaleza de la mutación del gen r-LDL (Leisterdorf E y col. *Circulation* 1993; 87:35-44; Jeenah M y col. *Atherosclerosis* 1993; 98:51-58, Sijbrands EJG y col. *Atherosclerosis* 1998;136: 247-254).

El principal ligando del receptor es la partícula LDL la cual contiene una sola copia de una proteína denominada la apolipoproteína B-100 (ApoB-100) (Goldstein J y Brown M J Biol Chem 1974;249:5153-5162). Esta apolipoproteína tiene una zona en la que abundan los aminoácidos básicos y es el lugar donde se une al receptor (Borén J y col. J Clin Invest 1998; 101: 1084-1093). Se han encontrado varias mutaciones en el gen de la apoB-100 que alteran la funcionalidad de la proteína y disminuyen la capacidad de retirada de las partículas LDL, dando como resultado el acúmulo de c-LDL en plasma. Hasta la fecha se han descrito cuatro mutaciones en el gen de apo B-100 que cursan con una hipercolesterolemia que se denomina apolipoproteína B defectuosa familiar (BDF), todas estas mutaciones se encuentran localizadas en el dominio de unión de la apo-B100; amino ácidos 3130-3630: R3480W, R3500Q, R3500W y R3531C (Soria L y col. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 587-591; Pullinger CR, y col. J Clin Invest 1995; 95:1225-1234; Gaffney D, y col. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15:1025-1029; Boren J, y col. J Biol Chem 2001; 276:9214-9218). Una mutación que cambia el codón de la posición 3500 CGG por CAG dando lugar a una sustitución de una Glutamina por Arginina (R3500Q), es la mas frecuente de toda las que cursan con BDF. Los pacientes heterocigotos para la mutación apo B-3500 son por regla general hipercolesterolemicos, aunque su concentración de colesterol total plasmático varía dentro del rango observado en pacientes con HF hasta concentraciones moderadamente elevadas. (Tybjaerg-Hansen A, y col. Atherosclerosis 1990; 80:235-242; Hansen PS, y col. Arterioscl Throm Vasc Biol 1997; 17:741-747). Dado que las características y bioquímicas de estos pacientes son muy similares, el diagnóstico diferencial entre los pacientes con BDF o HF sólo es posible a través del diagnóstico genético molecular.

El diagnóstico clínico de la HF se fundamenta en los datos analíticos de lípidos y lipoproteínas del plasma, sintomatología clínica (xantomas) e historia familiar y personal de enfermedad coronaria. La OMS a través de su programa MedPed recomienda una serie de criterios a seguir para llevar a cabo el diagnóstico clínico de HF. Estos criterios basados en una puntuación que depende de la historia personal y familiar de hipercolesterolemia características clínicas y analítica del paciente. Cuando la puntuación que alcanza el paciente es igual o superior a 8 puntos el criterio clínico de diagnóstico de HF se clasifica como "seguro", entre 5 y 8 puntos de "probable" y entre 3 y 5 puntos de "posible" (Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The

International MedPed FH Organization, Geneva 1998). Sin embargo, algunos pacientes no cumplen con los criterios de HF porque la historia familiar es incompleta o desconocida, o bien porque en el momento del análisis solo presentan concentraciones moderadas de colesterol plasmático y carecen de signos de depósito de colesterol en tejidos, tales como xantomas tendinosos, arco corneal o xantelasmas.

En familias cuyo mutación del gen del r-LDL se conoce se ha demostrado que el mejor "punto de corte" para el diagnóstico es el utilizar el percentil 90 para la concentración de c-LDL (Umans-Eckenhause MAW y col. Lancet 2001; 357:165-168. Sin embargo, el 18% de los pacientes portadores de la mutación presentan una concentración de colesterol total por debajo de este percentil, por otra parte, la proporción de falsos positivos fue también del 18%. Por lo tanto, se comete porcentaje alto de diagnósticos equivocados si se utiliza solo la cifra de colesterol plasmático. Se ha publicado, que más del 50% de los pacientes con HF no reciben tratamiento farmacológico hipolipemiente ni consejo dietético como consecuencia de no haber sido diagnosticados correctamente como pacientes con HF (Williams RR y col. Am J Cardiol 1993; 72:18D-24D).

El conocimiento de las bases moleculares de la HF ha permitido que se pueda realizar el diagnóstico inequívoco a nivel del ADN en la gran mayoría de casos: la demostración de un defecto molecular en el gen del r-LDL constituye una confirmación definitiva del diagnóstico (Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). El diagnóstico preciso de la HF es posible utilizando métodos de biología molecular, sin embargo, en la actualidad su utilidad en poblaciones heretogéneas se encuentra limitada debido a la gran heterogeneidad de las mutaciones del gen del r-LDL.

En la solicitud PCT WO-88/03175 (Biotechnology Research Partners, Ltd.) se reivindica un método para el diagnóstico de la aterosclerosis, que se basa en la detección de la presencia o ausencia de varios polimorfismos en la región génica de la apolipoproteína AI-CIII-AIV, o en los genes apoB, apoCI, apoAII, así como en el gen del receptor de LDL. Concretamente para este gen, se presenta el empleo de los polimorfismos Cfr131 y BstEII.

Otro documento de interés es la patente japonesa JP-10099099 que, se refiere al empleo de una mutación en el triplete codificante del aminoácido 109, en concreto la

inserción de una C, para el diagnóstico de anormalidades en el gen del receptor de LDL, aunque no se menciona concretamente la hipercolesterolemia familiar.

Finalmente, las patentes norteamericana US-4.745.060 y US-4.966.837, ambas de la Universidad de Texas, presentan métodos para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar basándose en mutaciones en el gen del receptor de LDL. Sin embargo, lo que se reivindica en la primera de ellas son secuencias correspondientes al gen "normal", presentando un ejemplo puntual de una mutación que se define por el cambio del mapa de restricción con Xba I. En la segunda patente, por su parte, se reivindica el empleo de varias enzimas de restricción (Eco RI, Asp 718, Taq I, Bam HI, Xba I, Inf. I, Bgl II, Cla I, Eco RV, Kpn I, Pvu II, Sph I, Sst I, Sst II, Stu I, Xho I, Nde I y Nsi I) en un método para determinar mutaciones en el gen r-LDL, que se basa en observar la alteración del modelo de restricción con estas enzimas frente al modelo correspondiente al gen normal.

El documento de patente más próximo a la invención es WO02/06467, en el que se describe un método de detección de errores en el metabolismo lipídico basado en una serie de mutaciones y polimorfismos del gen r-LDL. Sin embargo, ninguna de las mutaciones ni polimorfismos descritos en dicha patente coincide con los reivindicados en la presente solicitud.

Descripción detallada de la invención

La nomenclatura de las mutaciones y los polimorfismos viene definida en

- Antorakis S. E and the Nomenclature Working Group, Recommendations for a Nomenclature Systems for Human Gene Mutations. Human Mutation 11:1-3; 1998.
- Dunnen JT, Antorakis S.E. Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to describe Complex Mutations: A Discussion. Human Mutation 15:7-12, 2000.

Asimismo el concepto del polimorfismos se define en

- Harris H. The Principles of Human Biochemical Genetics 3rd Edition. Amsterdam. North-Holland 1980.
- Beauder AL, Scriver CL, Sly WS, Valle D. Genetics, Biochemistry and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes, En The Metabolic and Molecular Bases of

Inherited Disease. Editores Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D 7th Edition.
pg. 53 MacGraw Hill. New York 1995.

Se han detectado, aislado y caracterizado toda una serie de mutaciones nuevas que se detallan a continuación. Asimismo, toda una serie de mutaciones y polimorfismos ya descritos, se han combinado con aquéllas para analizar la probabilidad de que un individuo desarrolle hipercolesterolemia familiar. Todas las mutaciones y polimorfismos que en esta invención se relacionan con el desarrollo de la hipercolesterolemia familiar, se producen en la secuencia génica SEQ ID NO:1 correspondiente al gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL). Es decir, todas las mutaciones se producen en el mismo gen, se emplean en el mismo dispositivo de ensayo, utilizándose la misma tecnología, para determinar, según un mismo método, extracorpóreamente e in vitro, la probabilidad de desarrollar la misma enfermedad, lo que apoya el carácter unitario de la invención.

En la Tabla I se detallan todas las mutaciones nuevas detectadas, según la nomenclatura científicamente aprobada y detallada en las publicaciones mencionadas anteriormente. Asimismo se les otorga un código alfa-numérico. La Tabla IA contiene las mutaciones de la patente principal ES 200300206 y la Tabla IB contiene las mutaciones del presente certificado de adición a aquélla.

En la Tabla II se detallan mutaciones ya descritas y conocidas, cuyo uso en combinación con las mutaciones de la Tabla I, en dispositivos de ensayo in vitro para diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar es una de las formas preferidas, nueva e inventiva, de realización de la invención. Asimismo, de forma análoga a lo mencionado para las mutaciones conocidas, en la Tabla III se detallan polimorfismos.

Las mutaciones de amino ácidos se representan en códigos de una letra que tienen su equivalencia según la Tabla IV.

TABLA IA

	Mutación	Código
5	(-23)A>C	M002
	1054 del11	M006
	108delC	M008
	1197del9	M009
	1207delT	M010
10	1432delG	M012
	191-2delAinsCT	M016
	2184delG	M020
	231delC	M022
	2399del5/ins4	M024
15	313+1insT	M027
	338del16	M029
	510insC	M030
	675del15	M032
	684dup12	M034
20	941-39 C>T	M041
	C127R	M045
	C195R	M046
	C255G	M0100
	C319Y	M050
25	D157G	M059
	D630N	M063
	E291X	M068
	H635N	M096
	N59K	M074
30	T41M	M097
	W515X	M098
	Y379X	M092
	Y421X	M093

TABLA IB

35		
	T433N	M105
	818del8	M110
	1423delGC/insA	M111
40	1204insT	M112
	451del3	M115
	G516X	M117
	2389+4A>G	M120
	1815del11	M121
45	1186+5G>A	M129
	T740M	M131
	I771T	M135
	R279G	M138



	T446I	M141
	H562Q	M142
	C74Y	M145
	D686Y	M147
5	G(-2)R	M149
	E579D	M150
	S205C	M151
	D200V	M153
	V766E	M154
10	L(-6)P	M155
	2544insC	M156
	C42Y	M157
	2389+3A>C	M160
15	[1587-5del5;1587del31]	M161

TABLA II

	Mutación	Código
20	2393del 9	M001
	(-42) C/G	M003
	(-49) C/T	M004
	1045delC	M005
25	1061-8 T>C	M007
	A378T	M0102
	C358R	M0104
	1358 + 1 G/A	M011
	1706-10 G>A	M014
30	1845 + 1 G/C	M015
	2085del19	M017
	211del G	M018
	2140 + 5 G/A	M019
	2207insT	M021
35	2390-1G/C	M023
	313+1 G>C	M025
	313+1G/A	M026
	313+2GinsT	M028
	518 del G	M031
40	7delC	M035
	872delC	M036
	884delT	M038
	920ins4	M039
	A519T	M042
45	C113W	M043
	C255X	M047
	C281Y	M048
	C297F	M049

	C347Y	M051
	C371X	M052
	C646Y	M053
	C677Y	M054
5	C68W	M055
	C74G	M056
	C95R	M057
	D151N	M058
	D200G	M060
10	D200Y	M061
	D280G	M062
	E10X	M064
	E246A	M066
	E256K	M067
15	F634L	M069
	G322S	M070
	G352D	M071
	G571E	M072
	N543H	M073
20	N804K	M075
	Q12X	M076
	Q133X	M077
	Q357P	M078
	Q427X	M079
25	Q71 E	M080
	R395Q	M081
	R574W	M082
	R612C	M083
	S156L	M084
30	S205P	M085
	T413K	M086
	T705I	M087
	V502M	M089
	W(-18)X	M090
35	W541X	M091
	D679E	M094
	1359 -1 G>A	M099
	681ins21	M033
	C122X	M044
40	V408M	M088
	G528D	M106
	D412H	M107
	N619N	M108
	E80K	M109
45	L534P	M113
	L621S	M114
	C356Y	M116
	R329X	M119

5
10
15
20
25
30
35
40
45

	G248D	M122
	C201Y	M125
	313+5G>A	M126
	C358Y	M127
5	C331R	M128
	D157N	M130
	V776M	M134
	P664L	M136
	W462X	M137
10	Q328X	M139
	L584P	M140
	R395W	M143
	G314V	M144
	W469X	M146
15	P678L	M148
	R612H	M152
	R236W	M159

TABLA III

	POLIMORFISMOS	CÓDIGO
25	81T>C BstUI Exón 2	P1
	1060+10G>C SmaI Exón 7	P2
	1171G>A StuI Exón 8	P3
	1413G>A DdeI Exón 10	P4
30	1617C>T BstNI Exón 11	P5
	1725C>T SSCP Exón 12	P6
	1771C>T HincII Exón 12	P7
	1959 T>C AvaII Exón 13	P8
	2232G>A MspI Exón 15	P9

TABLA IV

	<u>CÓDIGOS AMINOÁCIDOS</u>		
40	Alanina	Ala	A
	Aspártico	Asp	D
	Glutámico	Glu	E
	Glicina	Gly	G
	Fenilalanina	Phe	F
45	Leucina	Leu	L
	Serina	Ser	S

	Tirosina	Tyr	Y
	Cisteina	Cys	C
	Triptófano	Trp	W
	Leucina	Leu	L
5	Prolina	Pro	P
	Histidina	His	H
	Glutamina	Gln	Q
	Arginina	Arg	R
	Isoleucina	Ile	I
10	Metionina	Met	M
	Treonina	Thr	T
	Asparagina	Asn	N
	Lisina	Lys	K
	Serina	Ser	S
15	Arginina	Arg	R
	Valina	Val	V
	Terminación	Ter	X

20 El dispositivo de ensayo (biochip) desarrollado en la invención consta de un soporte que presenta en su superficie toda una serie de sondas que se recogen en el listado de secuencias. Estas sondas oligonucleotídicas son capaces de hibridar con las secuencias mutadas contenidas en las Tablas I (IA y/o IB), II y III. La sistemática a utilizar sería la siguiente, para cada una de las mutaciones.

Impresión de los portas de vidrio

- Se imprimen los oligonucleótidos capaces de detectar la mutación en un porta de vidrio aminosilanado empleando DMSO como tampón de impresión.
- La impresión se lleva a cabo con un "spotter" o impresor de oligonucleótidos en el que se controlan la temperatura y la humedad.

Procesamiento de los portaobjetos de vidrio

- Tras la impresión se somete a un tratamiento con radiación ultravioleta.

Preparación de la muestra a hibridar

- Se extrae el ADN del paciente a partir de una muestra de sangre de aproximadamente 300 µl mediante un protocolo de filtración.

- Se amplifican para dicho paciente todos los exones y el promotor del gen del receptor LDL, a través de PCR multiplex.

- En la misma reacción de amplificación se incorpora un nucleótido unido a biotina constituyendo un marcaje indirecto que requiere un revelado final con un complejo

5 fluoróforo-estreptavidina.

- Se comprueba en gel de agarosa que ha tenido lugar reacción de amplificación.
- Se somete a fragmentación la muestra a hibridar.
- Se añade el tampón de hibridación.
- Se procede a la desnaturalización durante 15 minutos a 95 °C.

10

Hibridación

- La hibridación se lleva a cabo automáticamente en la estación desarrollada para tal fin por Amersham Biosciences.

- Se prehibrida el portaobjetos.

15

- Se inyecta con una pipeta Hamilton la solución a hibridar.
- Se hibrida durante 1 hora.
- Se lava 3 veces con tampón de lavado.
- La estación procede al secado del soporte de vidrio.

20

Escaneado del portaobjetos

- Se introduce el portaobjetos en el escáner.
- Se procede a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser.

25

Cuantificación de la imagen

- El software del escáner nos permite cuantificar en la imagen obtenida la señal de los puntos donde se ha producido hibridación.
- A partir de la señal que se obtiene en los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado establecemos la presencia o ausencia de la mutación en el paciente.

Cada mutación presenta en el portaobjetos cuatro oligonucleótidos repetidos 10 veces para su detección. Dos de ellos detectan el alelo normal y otros dos el mutado. La base interrogada se encuentra siempre en posición central.

5 En el caso de un individuo normal, no presenta alelo mutado. Por consiguiente en la imagen que se obtiene del soporte de vidrio los oligonucleótidos que detectan dicho alelo no presentan señal de hibridación o una señal menor que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal.

10 Por el contrario, un individuo heterocigoto para la mutación presenta el alelo normal y el mutado. De ahí que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado presentan una señal de hibridación equivalente.

Los resultados de la hibridación del ADN-chip con PCRs marcados, producidos a partir del ADN de los individuos a analizar, demuestran que el individuo normal no tiene una mutación puntual en el gen rLDL que ocasiona un cambio de aminoácido E256K, y que el individuo es heterocigoto para esa mutación. De esta forma el individuo heterocigoto quedaría diagnosticado genéticamente como hipercolesterolémico familiar.

15 A continuación se detallan mediante ejemplos el análisis de algunas de las mutaciones detectadas con el dispositivo de ensayo de la invención.

20 **EJEMPLO 1: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 1 del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 1 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex1F (SEQ ID NO :2) y Ex1R (SEQ ID NO:3).

25 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, hibridación a 59° C durante 1 minuto y elongación a 74° C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

30 Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón

anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

5.

Análisis de la mutación L(-6)P

Esta mutación (47T>C, CTC>CCC, Leu(-6)Pro) se caracterizó mediante secuenciación automática del fragmento de 215 pb correspondiente al exón 1 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex1F (SEQ ID NO:2) y Ex1R (SEQ ID NO:3). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio T>C observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Se llevó a cabo su confirmación posterior por secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 y SEQ ID NO: 250.

La mutación L(-6)P se encontró en una mujer de 47 años con arco corneal, cuyo padre tenía hipercolesterolemia con un CT de 350 mg/dL y dos tíos paternos con hipercolesterolemia habían fallecido de infarto de miocardio a los 24 y 33 años respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, c-LDL 320 mg/dL, TG 155mg/dL y c-HDL 49 mg/dL. El tratamiento hipolipemiante con atorvastatina (15mg/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 289 y 233 mg/dL respectivamente.

Análisis de la mutación G(-2)R

Esta mutación (58G>A, GGG>AGG, Gly(-2)Arg) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 215 pb correspondiente al exón 1 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex1F (SEQ ID NO:2) y Ex1R (SEQ ID NO:3). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229 y SEQ ID NO: 230.

La mutación G(-2)R se encontró en una mujer de 34 años con arco corneal, cuya madre presentaba hipercolesterolemia con un CT de 400 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar en esta paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Sus concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT de 354 mg/dL, c-LDL de 264 mg/dL, con TG dentro de la normalidad y c-HDL de 64 mg/dL.

EJEMPLO 2: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 2 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 183 pb del exón 2 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex2F (SEQ ID NO: 4) y Ex2R (SEQ ID NO: 5).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94° C

durante 1 minuto, hibridación a 59° C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

10 **Análisis de la mutación C42Y**

Esta mutación C42Y (188G>A, TGC>TAG, Cys42Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 183 pb correspondiente al exón 2 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex2F (SEQ ID NO:4) y Ex2R (SEQ ID NO:5). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257 y SEQ ID NO: 258.

La mutación C42Y se encontró en un varón de 17 años que presentaba arco corneal, y cuya madre tenía una hipercolesterolemia grave. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 350 mg/dL, con niveles de TG y c-HDL dentro de la normalidad. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (20 mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 274 y 214 mg/dL respectivamente.

Análisis de la mutación C74Y

Esta mutación C74Y (284 G>A, TGC>TAC, Cys74Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 196 pb correspondiente al exón 3 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex3F (SEQ ID NO:6) y Ex3R (SEQ ID NO:7). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado G>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221 y SEQ ID NO: 222.

La mutación C74Y se encontró en un varón de 52 años que presentaba arco corneal y xantomas tendinosos con historia familiar de hipercolesterolemia en la infancia. Fue diagnosticado de hipercolesterolemia familiar con una puntuación según los criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, TG 96 mg/dl y c-HDL 69 mg/dl. El tratamiento con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa a dosis de 10 mg/día redujo su cifra de c-LDL en un 22%.

EJEMPLO 4: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4A del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 242 pb de la zona 5' del exón 4 (4A) por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos: Ex4AF (SEQ ID NO: 9) y Ex4AR (SEQ ID NO:10).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94° C.

durante 1 minuto, hibridación a 63° C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip"):

10 **Análisis de la mutación 451del3**

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 242 pb correspondiente al exón 4 (4A) del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4AF (SEQ ID NO:9) y Ex4AR (SEQ ID NO:10). La posterior electroforesis en secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta delección de tres nucleótidos se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181 y SEQ ID NO: 182.

La mutación C74Y se encontró en un varón de 36 años que presentaba arco corneal y que había padecido un infarto de miocardio a los 34 años de edad. Este paciente tenía dos hijos de 2 y 8 años de edad con hipercolesterolemia grave con cifras de CT de 320 y 375 mg/dL respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar de este paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes de iniciar del tratamiento farmacológico hipolipemiente fueron: CT 449 mg/dL, c-LDL 367 mg/dL, TG 218 mg/dL y c-HDL 38 mg/dL. El tratamiento con simvastatina (40 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 270 mg/dL.

EJEMPLO 5: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4B del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 237 pb de la zona 3' del exón 4 (4B) por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex4BF (SEQ ID NO: 12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación D200V

Esta mutación D200V (662A>T, GAC>GTC, Asp200Val) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 237 pb correspondiente al exón 4B del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado A>T se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo

descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241 y SEQ ID NO: 242.

La mutación D200V se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 43 años con historia familiar de hipercolesterolemia en la infancia y cuya madre y hermano presentaban niveles de c-LDL por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar en esta paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Pravastatina, 40 mg/dL) fueron: CT 329 mg/dL, TG 73 mg/dl y c-HDL de 41 mg/dl y unos niveles de c-LDL de 273 mg/dL.

Análisis de la mutación S205C

La mutación S205C (677C>G, TCT>TGT, Ser205Cys) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 237 pb correspondiente al exón 4B del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos suministrados en el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>G observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237 y SEQ ID NO: 238.

La mutación S205C se encontró en una mujer de 39 años con historia familiar de hipercolesterolemia (madre y hermano con niveles de CT de 450 y 500 mg/dL respectivamente) y con 2 hijos con CT por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, realizado a los 20 años, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 390 mg/dL, 150 mg/dL y c-HDL 35 mg/dL y unos

niveles de c-LDL de 325 mg/dL. El tratamiento con simvastatina (10 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 270 mg/dL.

EJEMPLO 6: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 6 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 179 pb del exón 6 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex6F (SEQ ID NO: 14) y Ex6R (SEQ ID NO: 15).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP): los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 818del8

Esta mutación se pudo identificar por análisis de heterodúplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 6 cuando existe mutación muestra la presencia de dos banda heterodúplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homodúplex de 179 y 171 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heterodúplex que se forman migran a velocidad mas lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas.

Adicionalmente, esta mutación puede ser caracterizada por digestión del producto amplificado correspondiente al exón 6 del gen del rLDL con la endonucleasa de

restricción MaeIII; quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de MaeIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 118, 34 y 27 pb para el alelo normal y de 118 y 53 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169 y SEQ ID NO: 170.

10 La mutación 818del8 se encontró en una mujer de 69 años con dos hijos con cifras de CT de 382 y 304 mg/dL respectivamente y con evidencia de enfermedad cardiovascular prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 530 mg/dL, c-LDL 15 439 mg/dL, TG 170 mg/dL y c-HDL 57 mg/dL. El tratamiento con cerivastatina (0,4 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 363 mg/dL.

Análisis de la mutación R279G

20 Esta mutación R279G (898A>G, AGA>GGA, Arg279Gly) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 179 pb correspondiente al exón 6 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los 25 cebadores Ex6F (SEQ ID NO: 14) y Ex6R (SEQ ID NO:15). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio A>G observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 y SEQ ID NO: 210.

5 La mutación R279G se encontró en una mujer de 59 años con xantelasmas e historia familiar de hipercolesterolemia en padre y dos hermanos. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 384 mg/dL, c-LDL 314 mg/dl, con TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con simvastatina (80 mg/dl) redujo su concentración de c-LDL a 167
10 mg/dL.

EJEMPLO 7: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 8 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 220 pb del exón 8 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex 8F (SEQ ID
15 NO: 153) y EX8R (SEQ ID NO:154).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:
20 10 min de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, hibridación a 64° C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón
25 anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

30 Análisis de la mutación 1186+5 G>A

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 220 pb correspondiente al exón 8 del gen del rLDL al analizar este fragmento en

pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13).

Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197 y SEQ ID NO: 198.

Esta mutación se encontró en dos familias no relacionados con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas era una mujer de 45 años que presentaba arco corneal, xantomas tendinosos, xantelasmas e historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 411 mg/dL, c-LDL de 346 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con Cerivastatina (0,2 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 222 mg/dL.

EJEMPLO 8: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 9 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 224 pb del exón 9 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex9F (SEQ ID NO: 20) y Ex9R (SEQ ID NO: 21).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 1204inst

Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MboII. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MboII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 141, 45, 35 y 3 pb para el alelo normal y de 141, 45 y 39 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177 y SEQ ID NO: 178.

La mutación 1204insT se encontró en una niña de 12 años cuyo padre presentaba unos niveles de CT de 412 mg/dl y su hermano de 7 años un CT de 321 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 332 mg/dL, c-LDL de 267 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con resinas (15 g/día) redujo su cifra de c-LDL a 248 mg/dL.

EJEMPLO 10: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 10.

Se amplificó un fragmento de 278 pb del exón 10 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes desoxioligonucleótidos Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23).

La reacción de amplificación se llevó acabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,

200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxiligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minuto de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación T433N

Esta mutación T433N (1361C>A, ACC>AAC, Tyr433Asn) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 278 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se desarrolló en termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado C>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165 y SEQ ID NO: 166.

La mutación T433N se encontró en un varón de 50 años con arco corneal y con historia paterna de hipercolesterolemia y una hija de 21 años con niveles de CT de 310 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 6 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT 318 mg/dL, c-LDL 249 y con

concentraciones de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con lovastatina (20 mg/día) descendió su cifra de c-LDL a 199 mg/dL.

Análisis de la mutación T446I

5 La mutación T446I (1400C>T, ACC>ATC, Tyr446Ile) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 278 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213 y SEQ ID NO: 214.

La mutación T446I se encontró en una mujer de 64 años con antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura (angor a los 62 años) y con dos hermanos hipercolesterolémicos que habían sufrido un infarto de miocardio a la edad de 40 y 46 años respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Pravastatina) fueron: CT de 352 mg/dL, c-LDL de 281 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. Posteriormente, el tratamiento hipolipemiente con Simvastatina (20mg/día) se disminuyó su cifra de c-LDL a 150 mg/dL.

Análisis de la mutación 1423delGC/insA

Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MvaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 10 se hidrolizaron con 15 unidades de MvaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la

digestión tenían un tamaño de 150 y 128 pb para el alelo normal y de 128, 87 y 63 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 y SEQ ID NO: 174.

La mutación 1423delGC/insA se encontró en un varón de 34 años con historia paterna de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 554 mg/dL, c-LDL de 422 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente administrado (Atorvastatina 10 mg/día) tan sólo disminuyó su cifra de c-LDL a 406 mg/dl.

EJEMPLO 11: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 11 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 194 pb del exón 11 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minuto de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 65°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación [1587-5del5; 1587del31]

La mutación [1587-5del5; 1587del31] fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 194 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26).

Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta delección se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% tras la que pudieron observarse bandas de 194 y 158 pb correspondientes al alelo normal y mutado respectivamente. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO:263 , SEQ ID NO:264 , SEQ ID NO:265 y SEQ ID NO: 266.

La mutación [1587-5del5; 1587del31] se encontró en un varón de 43 años con arco corneal, historia de hipercolesterolemia en la familia (padre e hijo con hipercolesterolemia) y evidencia de enfermedad cardiovascular en la familiar (padre sufrió un infarto agudo de miocardio a los 50 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 345 mg/dL con niveles de TG de 160 mg/dl y c-HDL de 34 mg/dl. El tratamiento hipolipemiente combinada con Simvastatina (40 mg/día) y colestipol (10 g/día) disminuyó su cifra de CT a 208 mg/dl.

Análisis de la mutación G516X

Esta mutación (1609G>T, GGA>TGA, Gly516Stop) introduce un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción HphI. Quince microlitros del material amplificado del exón 11 se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 139, 43 y 12 pb para el alelo normal y de 81, 58, 43 y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 y SEQ ID NO: 186.

La mutación G516X se encontró en una mujer de 20 años con xantomas tendinosos e historia de hipercolesterolemia en la familia (madre y dos hermanos adolescentes con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 476 mg/dL, c-LDL 403 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa disminuyó su cifra de c-LDL a 202 mg/dL.

20

Análisis de la mutación H562Q

Esta mutación (1749C>A, CAC>CAA, His562Gln) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 194 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado C>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo

30

descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217 y SEQ ID NO: 218.

La mutación H562Q se encontró en una mujer de 37 años con historia de hipercolesterolemia y enfermedad coronaria en la familia (padre con hipercolesterolemia e IAM a los 48 años e hijo de 13 años con 500 mg/dl de CT). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 350 mg/dL con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (20 mg/día) disminuyó su cifra de CT a 333 mg/dl.

EJEMPLO 12: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 12 del r-LDL

Se amplificó un fragmento de 236 pb del exón 12 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex12F (SEQ ID NO: 155) y Ex12R (SEQ ID NO: 156).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación E579D

Esta mutación E579D (1800G>C, GAG>GAC, Glu579Asp) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 236 pb correspondiente al exón 12

del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex12F (SEQ ID NO: 155) y Ex12R (SEQ ID NO:156). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>C observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233 y SEQ ID NO: 234.

La mutación E579D se encontró en un varón de 49 años con historia de hipercolesterolemia en la familia (padre con 450 mg/dl de CT, hermano y dos hijos adolescentes con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 320 mg/dL, c-LDL 250 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (10 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 187 mg/dl.

Análisis de la mutación 1815del11

Esta mutación se pudo identificar por análisis de heterodúplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 12 cuando existe mutación muestra la presencia de bandas de heterodúplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homodúplex de 236 y 225 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heterodúplex que se forman migran a velocidad más lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193 y SEQ ID NO:194.

La mutación 1815del11 se encontró en 4 familias no relacionadas con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas, era una mujer de

69 años con arco corneal, evidencia de enfermedad cardiovascular prematura (angor a los 56 años) e historia de hipercolesterolemia en varios miembros de su familia (dos hermanos con CT de 700 y 435 mg/dL respectivamente). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Simvastatina, 40 mg/día) fueron: CT 444 mg/dL, c-LDL 368 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (30 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 225 mg/dL.

10 **EJEMPLO 13: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 13 del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 13 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex13F (SEQ ID NO: 27) y Ex13R (SEQ ID NO: 28).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

EJEMPLO 14: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 14 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 288 pb del exón 14 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex14F (SEQ ID NO: 157) y Ex14R (SEQ ID NO: 158).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 20 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxiligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación D686Y

La mutación D686Y (2119G>T, GAC>TAC, Asp686Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 288 pb correspondiente al exón 14 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex14F (SEQ ID NO: 157) y Ex14R (SEQ ID NO:158).

Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 225 y SEQ ID NO: 226.

La mutación D686Y se encontró en un varón de 31 años con xantomas tendinosos, arco corneal, evidencia de enfermedad coronaria prematura (angor) e historia de hipercolesterolemia en la familia (padre y varios hermanos con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó

una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 430 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante combinado con Atorvastatina (40 mg/día) y resina (5 gr/día) redujo su cifra de CT a 205 mg/dl.

5

EJEMPLO 15: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 15 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 243 pb del exón 15 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex15F (SEQ ID NO: 33) y Ex15R (SEQ ID NO: 34).

10

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 90 segundos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

15

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

20

25 Análisis de la mutación T740M

Esta mutación (2282C>T, ACG>ATG, Tyr740Met) introduce un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción NlaIII. Quince microlitros del material amplificado que incluía parte del exón 15 se hidrolizaron con 15 unidades de NlaIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 247 pb para el alelo normal y de 247, 194 y 53 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se

30

visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201 y SEQ ID NO: 202.

5 La mutación T740M se encontró en un mujer de 60 años con arco corneal, historia familiar de hipercolesterolemia y antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura en la familia (padre muerto de accidente cerebrovascular a los 34 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del
10 tratamiento farmacológico fueron: CT 492 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con atorvastatina (10 mg/día) disminuyó su cifra de CT a 251 mg/dL.

EJEMPLO 16: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 16 del r-LDL.

15 Se amplificó un fragmento de 273 pb del exón 16 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex16F (SEQ ID NO:159) y Ex16R (SEQ ID NO:160).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,
20 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

25 Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de
30 restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación V766E

La mutación V766E (2360T>A, GTG>GAG, Val766Glu) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 273 pb correspondiente al exón 16 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex 16F (SEQ ID NO: 159) y EX16R (SEQ ID NO: 160). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio T>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245 y SEQ ID NO: 246.

La mutación V766E se encontró en una mujer de 58 años con xantomas tendinosos en codos, xantelasmas, arco corneal, y con historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 12 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, c-LDL de 324 mg/dL y con niveles de TG y c-HDL normales.

Análisis de la mutación I771T

Como esta mutación (2375T>C, ATT>CACT, Ile771Thr), no cambia el mapa de restricción, se diseñó y sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HincII en presencia del alelo mutado y que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 142 pb del exón 16 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex16R (SEQ ID NO: 160) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada MutI771TF (SEQ ID NO: 161).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq

ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 61°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

5 Quince microlitros del material amplificado de parte del exón 14 se hidrolizaron con 15 unidades de HincII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 142 pb para el alelo normal y de 121 y 21 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de
10 poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205 y SEQ ID NO: 206.

La mutación I771T se encontró en una mujer de 60 años con evidencia de
15 enfermedad coronaria prematura en la familia e historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 422 mg/dL, c-LDL 368 mg/dL y unos niveles de TG y c-HDL normales.

20

Análisis de la mutación 2389+3 A>C

La mutación 2389+3 C>T fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 273 pb correspondiente al exón 16 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La
25 reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex16F (SEQ ID NO: 159) y Ex16R (SEQ ID NO:160). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis
30 System de Beckman. El cambio C>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:261 y SEQ ID NO:262.

5 La mutación 2389+3 C>T se encontró en un varón de 36 años con xantomas tendinosos en tendón de aquiles y extensores de la mano e historia de hipercolesterolemia en la familia (madre, hermano y un hijo con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 18 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 450 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El
10 tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (20 mg/día) redujo su cifra de CT a 259 mg/dl.

Análisis de la mutación 2389+4 A>G

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y sintetizó un desoxinucleótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BshNI en presencia del alelo mutado y que desaparece en
15 presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 194 pb del exón 16 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex16F (SEQ ID NO: 159) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada Mut2389+4 A>GR (SEQ ID NO: 160).

20 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C
25 durante 1 minuto, hibridación a 61°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado del exón 16 se hidrolizaron con 15 unidades de BshNI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la
30 digestión tenían un tamaño de 194 pb para el alelo normal y de 175 y 19 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta

mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 y SEQ ID NO: 190.

5 La mutación 2389+4 A>G se encontró en once familias no relacionadas con herencia de la hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas, era una mujer de 22 años con xantomas tendinosos, antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura en la familia (padre con hipercolesterolemia e infarto de miocardio a los 29 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones
10 plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 356 mg/dL, c-LDL 293 mg/dL con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante combinado con atorvastatina (40 mg/día) y resina (5 gramos/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 227 mg/dL.

15 **EJEMPLO 17: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 17 del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 242 pb del exón 17 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex17F (SEQ ID NO: 35) y Ex17R (SEQ ID NO:36).

20 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 300 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C
25 durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante dos minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 2544insC

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 242 pb correspondiente al exón 17 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se desarrolló en termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) con los cebadores Ex17F (SEQ ID NO: 35) y Ex17R (SEQ ID NO: 36) la posterior electroforesis en secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta delección se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253 y SEQ ID NO: 254.

La mutación 2544insC se encontró en un varón de 37 años que había sufrido un infarto de miocardio, xantomas tendinosos, arco corneal, e historia de hipercolesterolemia en la familia (su padre falleció prematuramente de infarto de miocardio). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 444 mg/dL, c-LDL 379 mg/dL y con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (40 mg/día) redujo su cifra de CT a 282 mg/dL.

REIVINDICACIONES

1.- Secuencia génica correspondiente a SEQ ID NO:1 que comprende al menos una de las siguientes mutaciones: T433N, 818del8, 1423delGC/insA, 1204insT, 451del3, G516X, 2389+4A>G, 1815del11, 1186+5G>A, T740M, I771T, R279G, T446I, H562Q, C74Y, D686Y, G(-2)R, E579D, S205C, D200V, V766E, L(-6)P, 2544insC, C42Y, 2389+3A>C, [1587-5del5;1587del31], de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

2.- Secuencia génica según la reivindicación 1 que comprende además, alguna de las siguientes mutaciones: (-23)A>C, 1054 del11, 108delC, 1197del9, 1207delT, 1432delG, 191-2delAinsCT, 2184delG, 231delC, 2399del5/ins4, 313+1insT, 338del16, 510insC, 675del15, 684dup12, 941-39 C>T, C127R, C195R, C255G, C319Y, D157G, D630N, E291X, H635N, N59K, T41M, W515X, Y379X, Y421X, 2393del 9, (-42) C/G, (-49) C/T, 1045delC, 1061-8 T>C, A378T, C358R, 1358 + 1 G/A, 1706-10 G>A, 1845 + 1 G/C, 2085del19, 211del G, 2140 + 5 G/A, 2207insT, 2390-1G/C, 313+1 G>C, 313+1G/A, 313+2GinsT, 518 del G, 7delC, 872delC, 884delT, 920ins4, A519T, C113W, C255X, C281Y, C297F, C347Y, C371X, C646Y, C677Y, C68W, C74G, C95R, D151N, D200G, D200Y, D280G, E10X, E246A, E256K, F634L, G322S, G352D, G571E, N543H, N804K, Q12X, Q133X, Q357P, Q427X, Q71 E, R395Q, R574W, R612C, S156L, S205P, T413K, T705I, V502M, W(-18)X, W541X, D679E, 1359 -1 G>A, 681ins21, C122X, V408M, G528D, D412H, N619N, E80K, L534P, 621S, C356Y, R329X, G248D, C201Y, 313+5G>A, C358Y, C331R, D157N, V776M, 664L, W462X, Q328X, L584P, R395W, G314V, W469X, P678L, R612H, R236W de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

3.- Secuencia génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende, además, alguno de los siguientes polimorfismos: 81T>C BstUI Exón 2, 1060+10G>C SmaI Exón 7, 1171G>A StuI Exón 8, 1413G>A DdeI Exón 10, 1617C>T BstNI Exón 11, 1725C>T SSCP Exón 12, 1771C>T HincII Exón 12, 1959 T>C AvaII Exón 13, 2232G>A MspI Exón 15, de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

4.- Uso de la secuencia génica de la reivindicación 1 en el diseño y la preparación de sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con alguna de las siguientes mutaciones: T433N, 818del8, 1423delGC/insA, 1204insT, 451del3, G516X, 2389+4A>G, 1815del11,

1186+5G>A, T740M, I771T, R279G, T446I, H562Q, C74Y, 686Y, G(-2)R, E579D, S205C, D200V, V766E, L(-6)P, 2544insC, C42Y, 2389+3A>C, [1587-5del5;1587del31].

5.- Sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con cualquiera de las mutaciones comprendidas en la secuencia génica de la reivindicación 1.

5 6.- Sondas oligonucleotídicas según la reivindicación 5 seleccionadas entre al menos unas de las SEQ ID NO: 153 a SEQ ID NO: 266.

7.- Uso de las sondas de la reivindicación 5 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar.

10 8.- Uso de las sondas de la reivindicación 6 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar.

15 9.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de la reivindicación 5, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

10.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de las reivindicación 6, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

20 11.- Dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 que comprende un soporte al que se acoplan además alguna de las sondas seleccionadas entre SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 152, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

25 12.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1.

13.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguna de las mutaciones de dicha SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 2.

30 14.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las

mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguno de los polimorfismos de dicha SEQ ID NO:1, descritos en la reivindicación 3.

5 15.- Método de diagnóstico según las reivindicaciones 12 a 14 que comprende amplificar fragmentos de ADN que contengan las mutaciones de la reivindicación 1, sólo
solas o en combinación con las mutaciones de la reivindicación 2 y/o los polimorfismos de la reivindicación 3, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello alguno de los desoxioligonucleótidos seleccionados entre SEQ ID NO: 153 a SEQ ID NO: 266 o combinaciones de los mismos, sometiendo los productos PCR a un análisis por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla
10 (SSCP), secuenciando aquellos fragmentos que presenten un patrón anómalo por SSCP para detectar las mutaciones que serían identificadas con posterioridad mediante análisis de restricción o mediante el dispositivo de ensayo de las reivindicaciones 9 a 11.

15 16.- Método de diagnóstico según las reivindicaciones 12 a 14 que comprende amplificar fragmentos de ADN que contengan las mutaciones de la reivindicación 1, sólo
solas o en combinación con las mutaciones de la reivindicación 2 y/o los polimorfismos de la reivindicación 3, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello alguno de los desoxioligonucleótidos seleccionados entre SEQ ID NO: 153 a SEQ ID NO: 266 o combinaciones de los mismos, conjuntamente con alguno
de los desoxioligonucleótidos seleccionados entre SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 152, sometiendo los productos PCR a un análisis por la técnica de polimorfismos de
20 conformación de cadena sencilla (SSCP), secuenciando aquellos fragmentos que presenten un patrón anómalo por SSCP para detectar las mutaciones que serían identificadas con posterioridad mediante análisis de restricción o mediante el dispositivo de ensayo de las reivindicaciones 9 a 11.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EFARMES, S.A.

<120> " CERTIFICADO DE ADICION A LA PATENTE 200300206 PARA UN PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GENICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR".

<130> P-100019

<160> 266

<210> SEQ ID NO.: 1

<211> 60.000

<212> polinucleótido

<213> humano

<220>

<221> gen

<223> rLDL

<400>

aaaagatggt gtatccattc aatggaacat tatttggcct ttaaaaggaa ggaaattctc 60
actgagcata gtggttttatg cctgtaatcc cagcactttg ggaggctgag gcagggggga 120
gggggcggtt cacctgaggt caggagttca agaccagcct ggccaacatg gtgaaatccc 180
gtctctacta aaaatacaaa aaaattagcc gagtgtggtg gcacacacct gtaagccagg 240
ctacacggga gactgaggca ggagaatcgc tggaaacccgg gaggcagagg ctgcagagag 300
ccgagattgc gtcactgcac tccagcctgg gtgacagagc gagactcttg tcttâaaaaa 360
aaaaagaagg aaggaaggaa ggaaggagg aagttctgac acaggctcca acacagatgt 420
tatgctcagt gaaataagcc agacatgaaa ggacaaatac tgcctgatct cattcataag 480
agggtccctag aattgtagaa tgggtgtgtgc cacgggctgg gagggggtgt ggccagagtt 540
tcagtttggg aagttgagaa tgttctggag atggatggcg gtagtgggtg ttgcacaact 600
gtgtgaatgc gcttaatgcc tctgaattgt gcagttacaa gtggttcgga tgggccgggc 660
gcggtggctc atgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggcaggtg gatcatgaga 720
tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac ggtgaaaccc catctctact aaaaaataca 780
aaaaattagc caggcatggt ggtgggcacc tgtagtccca gctacttggg aggcggaggc 840
aggagaatgg cgtgaacacg ggaggcagaa cttgcagtga gccgagatca cgccactgca 900
ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctâaaaaaa aaaaagtggg taagatgggc 960
cgggcatggg ggatcacgct tgcaatccca acactttggg aggctgaggt ggggtgattac 1020

ctgacctcag acgatccact ttggccttcc aaagtgctgg gattacagge ggggcccacc 3600
tttctctctct taatcacaca ggtaatccat acatacgaca ttcttttttt tttttgacac 3660
ggagtcttac tctgtcacct aggctggagt gcagtggcgc aatcttggct cactgcaacc 3720
tctgcctccc aggatcaagc aattctctctg cctcagcctc ctgagtagct gggattacag 3780
gtaaccatca ccacacctgg ctaaattttg tatttttagt agagacgggg tttcaccacg 3840
ttggccacgc tggtattgaa ctcttggtt caagtgatct tcctgtctcg gtctcccga 3900
gtgctgggat tacaggaatg agccactgtg cccggccaat acgacatctg tgcaatgaag 3960
tgcaacatat aagacaccct tccccaccc actgccccca ccaccgcccc caccgccccca 4020
cccccatctc cagatcagaa cctggggctg tgcaatttta aacgttgtag ccacttgcta 4080
cttgggtagt tgaagttcag tctcagccag gttggagtcc tggactctgg cccctctttt 4140
atttttattt tttatttttt tttgagacag agtctcgctc tgtcgcccag actggagcgc 4200
agtgggtgca tctcggtca ctgcaagctc tgcctcctga gttcacgcca tttccccgcc 4260
tcagcctccc gagcagctgg gactacagge gcccgccacc acaccgggt aatttcttgt 4320
attttttagt agagatgggg tttcaccctg ttagccagga tgggtctagat ttctgacct 4380
tatgatccgc ctgcctcggg cctcccaaag tgctgggatg acaggagtga gccaccgcg 4440
ccggcctctt ttttttttt tagacagtct ctgtcaccca ggctagagtg cgatgggtgcg 4500
atctcggctc actgcaacct ccaccttcg ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc 4560
tgagtatctg ggattacagg tgcctgtgac caccgcccgc tgatttttgt atttttagta 4620
gagacggggg ttcaccacat tggtcaggct agcctcaaac tcctgacccc gtgatccttc 4680
cgcctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggactctgg cccatcttgg ctgctgccaa 4740
tgtccttctt tctatcttgg tttttccaca gttacgcaca tgccagataa cggcgagtct 4800
gttccccagc aactgcaacg gatctgccc cactgggaa atggaagacc ttgcagccca 4860
ggtctttgta gaccaagatt agattgtggt caacaaacac ctgaccttgg cctttggaac 4920
catcagccat gtcagctaaa ataaaagcag aatctggctg ggcgcagtgg ctcacgcctg 4980
taatcccagc actttggggg gctgaggtgg gcagaccacc tgaggtccgg cgttctagac 5040
cagcctgacc aatatgatga aacccgtct ctactaaaca taaaaaatt agctgggcat 5100
ggtggcgggc acctgtaatc ccagctactc gggaggctga ggaaggagaa ttgcttgaac 5160
cctggaggca gaggttgag tgagccgaga ttgcgccact gcactccaac ctggactgca 5220
gaacaagact ctgtcccaa agcagataaa taaaaataaa taaaaataaa aatatggccg 5280
ggcatggtgg ctcacacctg taatcccaac actgggaaga tgaggcgggc agatcacgag 5340
gtcagggatt cgagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc cgtctctac taaaaataca 5400
aaaattagcc gggcatgatg ctgcatgcct gtaatccag ctactctgga ggctgaggca 5460
ggagaatcgc ttcaccccgg gaggtggagc ttgcagttag ctgagatcgc gccactgcac 5520
tctagcctgg gcaaaagagt gagactccat cgcaagaaaa aaaaaaaaaa aagctgcaag 5580
ctctgtctcc cgggttcaag tgattctcct gcctcagcct tccaagtagc taggattata 5640
cgcgcccgcc accatgcctg gctaattttt gtatttttag tagagatgcg gtttcaccat 5700
gttggccagg ctggtctcaa actcctgacc tcacgtgatc cacctgcctc ggcctcccag 5760
agtgtgaggga ttacagggtg gaacccctgc gcctggccaa gaaaagttgc ttgaatgaag 5820
agtaaataga agaccagaa agaaatgatt cgtccgagga aggtcacaga agcaacgtaa 5880
tcaagatgga aatctgactc ttctaattt tggccagact tccatccct ccaaagcttt 5940
ccagactctt ccagatcatt ctagatattt ccagaaatca ttcgtgaaat ctaactagga 6000
gtagtctgta aacaatgtgt ttcacacaga tacaattcat aaacgatgag aagacaagga 6060



























....
....

....
....

....
....
....
....
....

....
....
....
....
....

[illegible]

atgtggccca ggctggtttc caactcctgg gctcaagtga tcctcccacc tetgectccc 11160
 aaagtgtctgg ggattacagg catgagccac ctgcctggc ctctagtcgc tttatatatt 11220
 ttaacttaat ccttacaaga gccctgtgag ctagttacag gagcacaaat ggaaaccaag 11280
 aaacagaaaa atttatcagc atgactcagt cctcagagcc atgtatggcc gtgtccgtgc 11340
 atggcaggca ggtcaggggc ctggggaacg ctgttctgga aaccttggcc aggcttggc 11400
 acccgaggaa tgtgcttttc agagtttttg tggctctttt ccagacctgc cctgacctct 11460
 agctctggga actatgtaag ccaagtgcct tccgggaagg gagtccctct cctggtaact 11520
 ctttctgggt aaccagatgt ggactcatga cacacactga gcctacgtct tataattttt 11580
 tgtttttgtt tttgagacag tttcggctct ctgtcccagg ctggagtgc atggtgcgat 11640
 ctccggtcac tgcaacctct gcctcccagg ttcaagcgat tctcctgcct cagcctccct 11700
 agtagctgga attgcaggca tgcgccacca cgcctggcta attttttgta tttttttttt 11760
 tttagtagaa acgggggttc accttggttag ccaggctgggt caccaactcc tgacctcagg 11820
 tgatccgccc acctctgcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagac agctgtgagc 11880
 caccacgccc ggcgcatttt tttttctttt tttttcagag ggagtgtccc tctgtcacco 11940
 aggtgaagt gtagtggcgt gatctcgcc cactgtaacc tctatctccc aggttcaagt 12000
 gattctctg actcagcctc ccaagtagct gggactacag gcgctgcta ccatgcctgg 12060
 ctaatttttg tagttttagt agaaaccggg ttttgccatg ttggccaggc tggctctcaa 12120
 ctcttgactt caggtgatcc acctgccttg gcctctgaa gtgctgggat tatagggcatt 12180
 gagccactgt gactggccat cttaaatttt tttttttttt tttttttttt ttgagacagg 12240
 gtttactct gtcgcccagg ctggagtgc aaggcgcgat cttggttcac tgcaagctcc 12300
 gcctcctggg ttcatgccat tctcctgcct ctgcctcatg agtaactgag actacaggcg 12360
 cccaccacca cgcccgcta atttttttgt attttttttag tagagatggg gtttcacctt 12420
 gttagccagg atggtctcga tctcctgacc tcgtgatcca cccgtctcgg cctcccaaaa 12480
 tgctggcatt acaggcgtga gccaccgcac ccagccttaa attttttttt aagggaatc 12540
 aaaccagtg atattgggc agtacagtgg ctcacacctg taattccacc actttgggag 12600
 gctgaggcag gtgaatcacc tgaggtcagg agttcgagac cagcccgga aacatggcga 12660
 aaccccgctct ctactaaaaa taagaaaatt agccggcgt agtggcatgc acctgtaac 12720
 tcagctactc gggaagctga ggcatgagaa tcgcttgaac ctgggagcag gacgttgcat 12780
 tgaaccgata tcacaccact gcactccagc ctgggtgaca gagcaagact ctgtctcaaa 12840
 aaaaaaaga aaaaaaaatc cagtgatact tactttttaa atttttattt acttattttt 12900
 tgctttaagt tgaatcttta aacttatctt tttttttgag acacagtctc actctgtcgc 12960
 ccaggctgga gtgcagtgg acaaccacag ctcaagtgcag cgttgacctc ctgggctcaa 13020
 gccatcctcc cgcctcagcc tcccagtag ctgggactac aggcgcacac aaccatgtcc 13080
 agcttatttt tgtatttttt gtagagacag ggtccactg tgttgccctg gcttgttctg 13140
 aactcctagg ctcaagtgat cccccgcct caccctccca aagtgtggg attacaggca 13200
 tgagccacca catccagact tcaactttttt gtttaatgtc gcaaattggca taaggaatgg 13260
 gattcaatgg ggacacattt ataaacgttg cagcagctcc tagaacttgc ctatccttgt 13320
 aaacttctct aggtgattgc taattacttc tttttttttt tttttttttg agacggagtc 13380
 tcaactgtgc gccagggtg gagtacagtg gcgcaatctc gtctcactgc aaactccacc 13440
 tcccgggttc acgccattct cctgcctcag cctcccgagt agctgggact acaggcaacc 13500
 gccaccagc ccggctaatt ttttgatttt ttttttagta gaggtggggg ttcactgtgt 13560
 tatccaggat ggtcttgatc tctgacctc gtgatccacc tgccctcagcc tcccaaagtg 13620

.....

.....

.....

.....

ctgggattac aggcgtgagc caccatgccc agcccgctaa ttatttcaat ttgacctga 13680
cactgagcct gccagtagg ttcaagcatt ttgatggccc ctttacaggt tgggaaagct 13740
aatttatctg tccaaggccg aattctgaaa ctgagtctta actgccaaaa attcttatca 13800
tcaatttctt cttctgggtt gggcacagtg gctcatgcct gtaaagccag caatttgaga 13860
ggcatcatga tgcaagagga agaggattga gtgaagctag gagtttggga ccagcctggg 13920
caacatagtg agacccccatc tataaaaaaa aattaaaaat tagttgggca tgggtggtga 13980
ctcctgtggt cctagctatt caggaggctg aggtgggagg attccttgag ccagggttg 14040
acgctgcaga gagctgtgat cagccactg cagtcacagc tgagtgcagc ctggaaataa 14100
tgataaataa ataataaata attattttaa aaattataat aaaaataatt aaaaaattat 14160
tttcctgat taatcttttt tttgtcctt ctgagagttc aatttgtccc ttttctgcct 14220
ggtctcctag gtttccctaa aatcctgctg agagggttagc actgcctgcc aaagtcagtt 14280
tgcaaaatcc cagagaaatc cagcttattc ctgggggaac cgccaagact gccagccct 14340
gtgtgggggt caggcaagtt tctcacatgt gccttttttg caagaggcct ctggcaaccc 14400
catgagctcc caaagagact caattctaaa agttggtctc caccagctct ctgtggctta 14460
ggggttcaag ttcaactgtg aaagccctgt tttgttttga ttttgctttg agggagagga 14520
aaccgccctt ctgtttgttc aactccttct cctaagggga gaaatcaata tttacgtcca 14580
gactccaggt atccgtacaa ttgatttttc agatgtttat actcagccaa aggcgggac 14640
ccacaaaaca aaaaatattt ttttggctgt acttttgtga agattttatt taaattcctg 14700
attgatcagt gtctattagg tgatttggaa taacaatgta aaaacaatat acaacgaaag 14760
gaagctaaaa atctatacac aattcctaga aaggaaaagg caaatataga aagtggcgga 14820
agttcccaac atttttagtg ttttcctttt gaggcagaga ggacaatggc attaggctat 14880
tgagggatct tgaaaggctg ttgttatcct tctgtggaca acaacagcaa aatgttaaca 14940
gttaaacatc gagaaatttc aggggatctt ttcagaagat gcgtttccaa ttttgagggg 15000
gcgtcagctc ttcaccggag acccaaatac aacaaatcaa gtcgcctgcc ctggcgacac 15060
tttgaagga ctggagtggg aatcagagct tcacgggtta aaaagccgat gtcacatcgg 15120
ccgttcgaaa ctctcctct tgcagtgagg tgaagacatt tgaaaatcac cccactgcaa 15180
actcctcccc ctgctagaaa cctcacattg aaatgctgta aatgacgtgg gccccagtg 15240
caatcgcggg aagccagggt ttccagctag gacacagcag gtcgtgatcc gggtcgggac 15300
actgcctggc agaggctgcg agc atg ggg ccc tgg ggc tgg aaa ttg cgc 15350

met gly pro trp gly trp lys leu arg

-21 -20

-15

tgg acc gtc gcc ttg ctc ctc gcc gcg gcg ggg act gca g gtaaggcttg 15400
trp thr val ala leu leu leu ala ala ala gly thr ala v

-10

-5

-1 1



























ctccaggcgc cagaataggt tgagagggag cccccggggg gcccttggga atttattttt 15460
ttgggtacaa ataatactc catccctggg agacttgttg ggtaatggca cggggtcctt 15520
cccaaacggc tggagggggg gctggagggg ggcgctgagg ggagcgcgag ggtcgggagg 15580
agtctgaggg atttaaggga aacggggcac cgctgtcccc caagtctcca cagggtgagg 15640
gaccgcatct tctttgagac ggagtctagc tctgtcgcgc aggatggagt gcagtggcac 15700
gatctcagct cactgcaacc tccgctccc gggtttaagc gagtctctc tctcagcctc 15760
ccgaatagct gggattacag gcgcccaccc accacgccc cctaattttt gtatttttag 15820
tagagacggg ttttcacat tttggccagg ctggtctcga accccgacct cagggtgatct 15880

局
 部
 性
 特
 征

agatgggggtt tcaccacgtt ggccaggctg gtctcgaact cctgacctcg tgatccaccc 18460
gcctcagcct cccaaagtcc aaggattgca ggcgtgaccc actgtgccag ccaatcaatt 18520
gatttctcat tcattttcag ctggctctgt tcccttaagc caggggattt tcgtttgttt 18580
gtttccctt caaggaaatg attctagcta cagttttgat ttcttgtac aactgttttc 18640
agtagcacag ggaaagaaaa catcgaaagc attcaccacc tcatttgtgt gctgggggaa 18700
aaagcagaaa tgtgtattct ctttttttgt ttcgatgacc ttgttctga cttgttactc 18760
gtgacttgag agatcagagg gctagaggac tagaatttat agagggtgtt ttttgtttg 18820
tttatttttg ttcgagttgc ccaggctgga gtgcagtggc gcaatctcgg ctcaactgaa 18880
cctctgcctc ccaggttcaa gcgattcttc ggccctcagcc tctgagtag ctggaactac 18940
agggcccccgc caccacaccc agctaatttt tgtatttttc agtagagatg ggatttcacc 19000
atattgggtca agctggcctc gaactcctga cctcgtgatc caccgcctc agtttcccaa 19060
agtgtcggga gtacaggcgt gagccgcgt gccggcctt tttgtgtttt tgtgtttttg 19120
agaggagctc attgcttttt aggcctccct agcgtgagaa aatctgggga tccatgctct 19180
agtttacttc cttttttttt ttttttttga gatggagtct cgcttagatt gcctaacttc 19240
agctcattgo aacttctgcc tccgggttc aagggtattct cgtgtctcag cctcctgggt 19300
agctaggata cgggcacccg ctaccatgcc tggctaattt tgtactttta gtagagacag 19360
ggtttcgcca cgttggccag gctggtctcg aactcctgac ctgaggtgag ccgcctgcct 19420
tggcctccca aagtgtgag attacaggcg tgagccaccg cgcttggcct aatttgcttt 19480
tctgaaatt caaatggtct aatatgaaaa acgccaacct tgcttgaaag aataagaaag 19540
aggtgcgggtt tcgttgggoc gttgatgttt ggaacaggac tggttttgtc cccttgctcg 19600
gaaagggcag caactgtgag gacagctccc tgacgtgctc tcaactcagca ctgttccgtt 19660
cctgagcact gtcccccacta gctaggccaa gggagctcat ttggcaggca actgctgtct 19720
ggctgcgcct gtggcagtaa aatctgcctt ttttttttgg aggcagggtc ttgccctgtc 19780
gctcaggctg aagtgtgcag ttatagctca ctgcagcctc cagcttctgt actcaactga 18940
tctcctctc tcagcctcct gagtagctgg gactatacgc acgtgttacc actccacct 19900
cagtttgttt gtttatttat ttatttattt atttattgag atggagtttt gctcttgctg 19960
cccaggtgg agtgcaatgg cgcgatctcg gtcaccgca acctccact cctggttcaa 20020
gcgattctcc tgcctcagcc tctgagtag ctgggattac aggcattcac caccacgcc 20080
ggctaatttt gtatttttcg tagagatggg gtttctccac attggttcag gctgttctcg 20140
aactcccaac ctgagtgat ccacccgcct cagcctccca aagtgtcggg attataggcg 20190
tgagcccccg aaccggcca ctccagcta agtttaaatt tttgtttgt ttgttcgttt 20260
gtttttattt tttgagacag agtctccgc ccaggctgga gcgcagatca ctgcacctt 20320
gacctccag gcttaagcca tctcccccac tcagcctccc aagtagctgg gattacaggt 20380
gtgtgccact atgcttggct aagttgtgta tttttttag agatgggggt caagggttc 20440
tcgctttgtt gcctcggtt gtctcaact cctgggtcga agcagtcctc cctcctcagc 20500
ctcccaagg gctggggaaa tccacttttg aaacattgtc tggagagttg ccaggtggt 20560
agatcacaga aataggctcat cgtggggctc ttcccatggg tgcagtcctg agccacctgt 20620
ggccagcaaa tatttgaga ataatagta ggggagagct tgaggtccag ggaaagggtt 20680
tgtttttctt cagggaagg tttttattgt tctttatccc tcttaaagg accttcaggt 20740
gttactgaca ttcccggtct acccagtggt acatttagtt tgtaagctgg gccctcgtac 20800
agaggtaggg aggtgagagc attggattag tggtcaccaa agctgcggtc acctagtggg 20860
gtgatcagag gctcctccct taagatcttg attgccaaag cctctggccc aactttcctt 20920

Figure 1 shows a vertical sequence of seven diagrams illustrating the steps of the bubble sort algorithm. Each diagram consists of a 4x4 grid of dots, where the dots are arranged to represent numbers. The sequence of numbers shown in each diagram is as follows:

- Diagram 1: 1, 2, 3, 4
- Diagram 2: 1, 2, 4, 3
- Diagram 3: 1, 3, 2, 4
- Diagram 4: 1, 3, 4, 2
- Diagram 5: 1, 4, 3, 2
- Diagram 6: 2, 1, 3, 4
- Diagram 7: 2, 3, 1, 4

5

10

15

A 10x10 grid of dots where the number 5 is formed by black dots. The number 5 is composed of a vertical bar on the left, a horizontal bar in the middle, and a vertical bar on the right.

A 5x5 grid of dots forming a stylized letter 'A'. The top row has 3 dots, the second row has 4 dots, the third row has 5 dots, the fourth row has 4 dots, and the bottom row has 3 dots.

ctgaggcagg agaatggcgt gaacccggga ggcggagctt gcagtgagcc aagatcgtgc 27960
cactgtactc cagcctgggc gacagagcaa gactctgtct caaaaaaaaa aaaaaaagtgc 28020
ggattgacat tctcttcaaa gttctgggggt tttcctttgc aaagacagga ttggcaaggc 28080
cagtgggtct tttttgtgtg tgtgtgtgtg acggagtctc actctgccac ccaggctgga 28140
gtgcaatggc aggatctcgg ctcaccgcaa cctcctcctc ccagggtaaa gtgattctcc 28200
tgcctcagcc tcccgagtag ctgggactac aggtgcccg caccacaccc aactaatttt 28210
tgtattttta gtagagacag ggtttacta tattggccag gctgggtcttg aacctctgac 28320
ctcactgat ccacccgcct tggcctccca aagtgtggtg attacaggcg tgagccactg 28380
tgctcggcct cagtgggtct ttcctttgag tgacagttca atcctgtctc ttctgtag tg 28440
eu
tct gtc acc tgc aaa tcc ggg gac ttc agc tgt ggg ggc cgt gtc aac 28488
ser val thr cys lys ser gly asp phe ser cys gly gly arg val asn
45 50 55
cgc tgc att cct cag ttc tgg agg tgc gat ggc caa gtg gac tgc gac 28536
arg cys ile pro gln phe trp arg cys asp gly gln val asp cys asp
60 65 70 75
aac ggc tca gac gag caa ggc tgt c gtaagtgtgg cctgtccttt 28581
asn gly ser asp glu gln gly cys p
80
gctattgagc ctatctgagt cctggggagt ggtctgactt tgtctctacg gggtcctgct 28641
cgagctgcaa ggcagctgcc ccgaactggg ctccatctct tgggggctca taccaagcct 28701
cttccgccct tcaaatcccc ccttgaccag gaggcattac aaagtgggga tgggtgctacc 28761
tcttcgggtt tgtcacgcac agtcaggag gctgtccctg ccgagggcta gccacctggc 28821
acacacactg gcaagccgct gtgattcccg ctggctcgtga tccccgtgat cctgtgatcc 28881
ccgccccgtg aggtgaaca catagtacg cttgttagcc aagcctcaat gacccacgta 28941
acatgaaggg ggaagagcca gaaagtctg ccaaggagca aggccaagaa tcccgaggg 29001
aaatggactt tgaagctggg cgtcttcttg gctgtcttaa tacaagtggc acatccaaat 29061
ccaaaacccc gaaattcaaa gtcttgagca ccgaaaattc tgaaacgtct tgagcactga 29121
cctttagaag gaaatgctta ttggagcatt ttggatttcg gatttttacc actgagtgtg 29181
gagtcctaata taggaaaaaa accaggctga ccgaaccaa ggaaagcaat aaaagaaggc 29241
agatagggtc aggcacggtg gtcacccct gtaatcccag ccttttgaga ggctgaggcg 29301
ggtggatcac ttgaggtcag gatttcgaga gcagcctggc caacacggtg aaaccccatc 29361
tctactgaaa atacaaaaac tagccaggta tgggtggcgtc tgcctgtaat ccagctact 29421
cgggaggctg agacaggaga atcacttgaa cctgggaggc agaggttgca gtgagccaat 29481
atcacgccat tgcactccag cctgggggac aagagcgaaa ttctgtctca aaaaaaaga 29541
agaagaaggc cgacaaacta tgtaactctg cctttctcca tgggtccagaa cacacagccc 29601
tctgcgtaa ataactcctt atcttctgc tcccagctat catcagacac ctgggctgat 29661
agaaaattgc aagttagctc actgcaacct cggcattata agtactgcac aaagccctct 29721
tcagcgcaca gcacaagcac cattctataa aatctccagc aagcggccag gtgcagtggc 29781
tcatacctgt aatcccagca ttttgggaga ctgaggcggg cggatcacct gaggtcagga 29841
gtttgagacc agcctggcca acatggtgaa acccgtctc tattaataat acaaaaaaat 29901
tagccaggcg tgggtggcagg tgccgtgtaat ccagctact tgggaaggctg aggcaggaga 29961

atcgcttgaa cccgggaggt ggaagttgca gtgagccgag atcttgccat cgactccag 30021
cctggggggac aagagtgaga cttcgtctca aaaaaaaaaa aaaaaattcc cagcaagcct 30081
ttgtcttctg gcagtcagct cctctcttgc tgacctgctc attgctttct tgcaaggat 30141
tttctacct actttctgga ataaatctgt ctttctgtac ttacaactac cttttttaa 30201
atttctttct ttttgagat ggagtctcac tctgtttgcc caggctggag ttcagtggg 30261
caatctcagc tcaactgcaac ctctacctac tgggttcaag cgattctcct gcctcagctt 30321
cccagtagc tgggattaca ggcgtgcacc agcacgcagg ctaatttttg tatttttagt 30381
agagacgggg ttccaccatg ttggccaagg tggctttgaa ctctgacct caagtgatcc 30441
tcccacctca gcctcccaaa gcgctaggat taaggccatg agccactgag gccggctgca 30501
cctacaactg tcttgataaa ttcttaccac cacaccactg gtccagatag tcagtgtca 30561
cccacaacat taaggatatt ccaaatttga aacattccaa aatcagaaaa atattccaac 30621
tctgaaaata ttccaaaatc caaaaaaatt caaaatccaa aacacttctg gtcccaagca 30681
ttttagagaa gggatactca acccaaaata aggacagcaa ttctataaat tgtgctacca 30741
tcttgaggt ctcagtttaa cagctttaca cctattagcg caccagtgt catagcagt 30801
ctgggaaatg tgtacagatg aggaaactga ggcaccgaga ggcagtggt tcagagtcca 39861
tggccctga ctgctcccca gccgccttt ccaggggcct ggcctcactg cggcagcgtc 30921
cccggctata gaatgggctg gtgttgggag acttcacacg gtgatgggtg tctcggccca 30981
tccatccctg cag cc ccc aag acg tgc tcc cag gac gag ttt cgc tgc 31029
ro pro lys thr cys ser gln asp glu phe arg cys
85 90 95
cac gat ggg aag tgc atc tct cgg cag ttc gtc tgt gac tca gac cgg 31077
his asp gly lys cys ile ser arg gln phe val cys asp ser asp arg
100 105 110
gac tgc ttg gac ggc tca gac gag gcc tcc tgc ccg gtg ctc acc tgt 31125
asp cys leu asp gly ser asp glu ala ser cys pro val leu thr cys
115 120 125
ggg gcc agc ttc cag tgc aac agc tcc acc tgc atc ccc cag ctg 31173
gly pro ala ser phe gln cys asn ser ser thr cys ile pro gln leu
130 135 140
tgg gcc tgc gac aac gac ccc gac tgc gaa gat ggc tcg gat gag tgg 31221
trp ala cys asp asn asp pro asp cys glu asp gly ser asp glu trp
145 150 155
ccg cag cgc tgt agg ggt ctt tac gtg ttc caa ggg gac agt agc ccc 31269
pro gln arg cys arg gly leu tyr val phe gln gly asp ser ser pro
160 165 170 175
tgc tcg gcc ttc gag ttc cac tgc cta agt ggc gag tgc atc cac tcc 31317
cys ser ala phe glu phe his cys leu ser gly glu cys ile his ser
180 185 190
agc tgg cgc tgt gat ggt gcc ccc gac tgc aag gac aaa tct gac gag 31365
ser trp arg cys asp gly gly pro asp cys lys asp lys ser asp glu
195 200 205

gaa aac tgc g gtatgggcgg ggccagggtg ggggcggggc gtcctatcac 31415
glu asn cys a

210

ctgtccctgg gctccccag gtgtgggaca tgcagtgatt taggtgccga agtggatttc 31475
caacaacatg ccaagaaagt attcccattt catgtttgtt tctttttttt cttttctttc 31535
tttattttgt ttttgagatg gagtctcact ctgtgatttt tttcatctct aaatttccta 31595
catccatattg gccaccatga ggccccaggc tggccgatgg ttgctgttag cttattggga 31655
aatcactgtt tggaagggtg tggttgtttt ttgttgtttg ttgtttttgt ttttgtttt 31715
gttttgagac ggagtctcgc tctgtcgcca ggggtggagtg cagtggcgcg atcagctcac 31775
tgcaacctcc gcttctggg ttcaagccat tctcctgcct cagcctccca agtagcgcg 31835
attacaggca tgtgccacca cctccggcta ttttttttct tatttagtag agatgggggt 31895
tcaccatgtt agtcagggtg gtcatgaact cttgacctca ggtgatccac ccgcctcggc 31955
ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgca ctgctgcacc cagccttttt ttgtttttt 32015
gagacagggt cttgctgtca cccaggttga agtaagggtg cagcattatg gctcactgcg 32075
gccttgatct ccttggctca agcgatcctc tcaacttcagc ctctcaagca gttggaacca 32135
caggctgtac caccaagcct ggccaatttt tttgtacaga cacaggctgg tcttgaactc 32195
ctgggctcaa gcaatcctcc tgccttggcc tcccaaagtg ctgggattcc aggcattgagc 32255
cgctgcaccc ggcaaaaggc cctgcttctt tttctctggt tgtctcttct tgagaaaatc 32315
aacacactct gtcctgtttt ccag ct gtg gcc acc tgt cgc cct gac gaa 32365

la val ala thr cys arg pro asp glu

215

ttc cag tgc tct gat gga aac tgc atc cat ggc agc cgg cag tgt gac 32413
phe gln cys ser asp gly asn cys ile his gly ser arg gln cys asp
220 225 230 235
cgg gaa tat gac tgc aag gac atg agc gat gaa gtt ggc tgc gtt aat 32461
arg glu tyr asp cys lys asp met ser asp glu val gly cys val asn
240 245 250

g gtgagcgctg gccatctggt tttccatccc ccattctctg tgccttgctg 32512

v

cttgcaaatg atttgtgaag ccagagggcg cttccctggt cagctctgca ccagctgtgc 32572
gtctgtgggc aagtgaactg acttctcaga gctcacttc cttttgtttt gagacggagt 32632
ctcgtctga caccaggct ggagtgtgtt ggcacaatca cagctcaagg cagcctctgc 32692
ctctgatgtc cagtgattct cctgcctcag cctcccgagt agctgagatt aaaggcgtat 32752
accaccacgc ccggctaatt ttttgtattt ttattagaga cagggtttct ccatgttggc 32812
caggctggtc ttgaactcct ggtctcagggt gatccacccg cctcggcctc ccaaagtgt 32872
aggattacag gtgtgagcca ctgcgccagg cctaattttt ttgtattttt agtagagatg 32932
cggttttgcc atattgccca ggctggctc gaactcctgg gctcaagcga tctgcctgcc 32992
ttggcctccc aaagtgtggt gattacaggc acaaaccacc gtgcccgcag cgttttctta 33052
atgaatccat ttgcatgctg tcttatgtga ataaactatt atatgaatga gtgccaagca 33112
aactgagggt cagacacacc tgaccttctt ccttctctc totggctctc acag tg aca 33271
al thr

ctc tgc gag gga ccc aac aag ttc aag tgt cac agc ggc gaa tgc atc 33219
leu cys glu gly pro asn lys phe lys cys his ser gly glu cys ile

255

260

265

acc ctg gac aaa gtc tgc aac atg gct aga gac tgc cgg gac tgg tca 33267
thr leu asp lys val cys asn met ala arg asp cys arg asp trp ser

270

275

280

285

gat gaa ccc atc aaa gag tgc g gtgagtctcg gtgcaggcgg cttgcagagt 33319
asp glu pro ile lys glu cys g

290

ttgtggggag ccaggaaagg gactgagaca tgagtgtgt agggtttttg gaactccact 33379

ctgcccaccc tgtgcaaagg gctccttttt tcatttttgag acagtctcgc acggtcgccc 33439

aggctggagc gcaatggcgc gatcttggct caaccacaacc tccggctccc aggttcaagc 33499

gattcttctg cctcagcctc ctgagtagct gggattacag ctgaatgccca cettgctggg 33559

ctaatttttg tatttttagt agagatgggg tttcaccatg ttggccaggc tggcctcgaa 33619

ctcctgaact cgagtgatct gcccgctcc tgaagtgtg ggattacagg cgtgagccac 33679

ctcgtcctgg tgagggtttt tttttttccc caaccctctg tgggtggatac tgaaagacca 33739

tattaggata actgtacagt atagagaagg cagtggcaag ttttctctgt catataccag 33799

agtgggcttg ggcattggtg catactcctg tagtctcagc taatcaggag gctgaggaag 33859

gaggatcgct tgggcccagg agttggagac tgtagtgagc tgtgatcaca ccaccacact 33919

tcaatctggg caacagagca agagacccta tctctaaaaa aaagtaagta tttcggacac 33979

tgtgggcat acggtctctg gtgcagtttc tcaacatggc tgttgggtga acacaaccac 34039

gcacagaacg caaaccaata cagtggtctg tgggcccaga aaatgttatt tatggacaca 34099

aaaattggaa tttcatataa ctgttttggt tcatgaaaat gatttccctt tttattttta 34159

ttttcttct caagtattta aatatgtaaa agccattttt aggcctggca ggatgggtca 34219

cagctgtaat cccagcactt tgggaggtcg aggcgggagg atcacgaggt caggagatcg 34279

agaccatcct ggccaacaca gtgaaacccc gtcttacta aaaatacaaa aaattaacca 34339

ggcttgggtg cgcgctctg tagtcccagc tgctcaggag gctgaggcag gagaatcgct 34399

tgaatgcagg aggcggagggt tgtagtgagc cgaggttgca ccaactgcact ccagcctgag 34459

cgacagagtg agagtccgcc tcaaacaaaa aaatgtttgc ccatgctggt cttgaactcc 34519

tgggctcaag ctatctgcct gccttgggtc cccaaagtgc tgggattaca ggcatgagct 34579

acagcgcccg gacttttggt gttttatata tatatatcta tatataactt gttttatgta 34639

tatatataac ttgttttata tatatacata aactgcagta aaaaacatgt aacataaaat 34699

ttaccttctc aaaccttatt aagtgcacag ttctgtgcca ttagcaaatt cacactgttg 34759

tacaacatca caaccacat ctccagaact tttttttttt tttttattct ttttgagaca 34819

gagtctcact cgtcgcacgg gctggagtg agtggtgcca tctcggttca ctgcaacctc 34879

cacctaccag gttcaagcaa ttctcctgcc tcagccccct cagtagctgg gattacaggt 34939

gcccgtccta ccacgcccag ctaatttttg tattttcagt agagactgac tgggtttcac 34999

catgttggcc aggtgtgtct cgaactcctg acctcaagt atcctccac ctcagcctcc 35059

caaagtgtg ggaatacagg catgagccac tgcgcccggc cccagaactc ttttatcttc 35119

ccaaactgaa gctctgtccc catgaaacac tcaactctca tcccctcccc aactcctggc 35179

accaccatt ctactttctg tccctatgaa tgtgatggct ctagggacct cctctgagtg 35239

gaatcagaca gcattttcct tttttgactg gcttatttca ctgagccaag tgcggtggca 35299

cagcctgta atcccaaaac tttgggagac cgaggcgggc gcatcaccag aggacaggag 35359
 nncgagacca gcccggccaa cagggggaaa ccccatcact agggagcctg cagaaagaaa 35419
 gccaccacat ggctgtctgg agccacacaa tcccagcaaa acagggacgc taaacgtagg 35479
 agaaacacac aaccccagga ggcggagggtc gcagttagcc gagatcgtgc cattacactc 35539
 cagcctgggc aacaagagtg aaactccgtc tctcctaaaa atacaaaaaa attagctggg 35599
 catgggtggca catgcctgta gtcccagcta cttgggaggc tgaggcagga gaatcacttg 35659
 aacccggggag gtggagggtt taatgagcca aggttgggcg cgaagggatg ggtagggggc 35719
 cgagagtgc cagtctgcat cccctggccc tgcgcag gg acc aac gaa tgc ttg 35773
 ly thr asn glu cys leu
 295
 gac aac aac ggc ggc tgt tcc cac gtc tgc aat gac ctt aag atc ggc 35821
 asp asn asn gly gly cys ser his val cys asn asp leu lys ile gly
 300 305 310
 tac gag tgc ctg tgc ccc gac ggc ttc cag ctg gtg gcc cag cga aga 35869
 tyr glu cys leu cys pro asp gly phe gln leu val ala gln arg arg
 315 320 325 330
 tgc gaa g gtgatttccg ggtgggactg agccctgggc cccctctgcg cttcctgaca 35926
 cys glu a
 tggcaaccaa acccctcatg cctcagtttc cccatctgtt aagtgtgctt gaaagcagtt 35986
 aggaggggtt catgagattc cacctgcatg gaaaactatc attggctggc cagagtttct 36046
 tgcctctggg gattagtaat taagaaattt caggccgggt gcgtaatccc tgtaatccca 36106
 acaccttggg acgccgaggc gggcagatca cctgaggctg ggagttccag accagcctga 36166
 ccaacatgga gaaaccccggt ctctactaaa aatacaaaat tagccgggct tgggtggtgca 36226
 tgcctataat cccagctact caggaggctg aggcaggaga atcacttgaa cctgggagggt 36286
 ggaggttgtg gtgagccaag atcgtgccat tgcactccag cctgggcaac aagagtgaaa 36346
 ctccatccaa aaaaaaaaga aaagaaaaga aaaaaaagaa aagaaatttc agctgacaca 36406
 gcttcacact cttggttggg ttcccgtggt gaatgatgag gtcaggtgat gactggggat 36466
 gacacctggc tgtttccttg attacatctc ccgagaggct gggctgtctc ctggctgcct 36526
 tcgaagggtg gggttttggc ctgggccccca tcgctccgtc tctagccatt ggggaagagc 36586
 ctccccacca agcctctttc tctctcttcc ag at atc gat gag tgt cag gat 36638
 sp ile asp glu cys gln asp
 335
 ccc gac acc tgc agc cag ctc tgc gtg aac ctg gag ggt ggc tac aag 36686
 pro asp thr cys ser gln leu cys val asn leu glu gly gly tyr lys
 340 345 350 355
 tgc cag tgt gag gaa ggc ttc cag ctg gac ccc cac acg aag gcc tgc 36734
 cys gln cys glu glu gly phe gln leu asp pro his thr lys ala cys
 360 365 370
 aag gct gtg g gtgagcacgg gaaggcggcg ggtgggggag gcctcaccac 36784
 lys ala val g
 375
 ttgcaggcag cagtgggtggg ggagtttcat cctctgaact ttgcacagac tcatatcccc 36844

tgaccgggag gctgtttgct cctgagggct ctggcagggg agtctgccgc cctgttagga 36904
 cttgggcttg ccagggggat gcctgcataat gtcctagttt ttgggaatat ccagttaacg 36964
 gaaccctcag ccctactggg ggaacaggaa cgggctttcc tttcagggac aacctgggga 37024
 gtgacttcaa ggggttaaag aaaaaaaatt agctgggcat ggtgccacac acctgtggtc 37084
 ccagctactc agaaggctga ggcggggagga ttgcttgagg gcaggaggat tggttgatcc 37144
 tcccacctca gcctccggag tagctgggac ctccaggtgca tgccactatg cctggctaata 37204
 tttctttttt cttttttttt ttttttcgag acggagtctc gctctgttgc ccaggctgga 37264
 gtgcagtggc aggatctcgg ctcaactgcaa gctccgcctc ccgggttcac gccattctcc 37324
 tgcctcagcc tcccagtag ctgggactac aggagccgc cactgcacca ggccaatttt 37384
 tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac tgtgttagcc aggatgggtct cgatctcctg 37444
 acttcgtgat ccgccacct cggccttcca aagtgcctcg attacaggcg tgagccactg 37504
 cgcccagccg ctaattttca ttttttagt aaaaacaggg tttcaccatg ttggccaggc 37564
 tagtcttgaa ctccctgaacc caagtgatcc tcctgccttg gcctcccaaa gtgctgggat 37624
 tacagacacc acacctggct attattattt tttagagaca ggggtgctgct ctatcttcca 37684
 gcctgtagtg cagtgcagcc tccatcatag ctgctgcag ccttgacctc ctgggttcac 37744
 gtgatcgtcc cgcctaagcc tctggaggag ctgggagtac tggcatgtgc caccatgcct 37804
 ggttaatttt tttttttttt tttttgagac agagtctcat tctgtcacc ccaggctggagt 37864
 gcgggtggtgc gatcttggct tactgaaacc tccacctccc aggttcacagc aattctcctg 37924
 cctcacct ctgagtagct gggattacag gttccggcta ccaacctgg ctagtttttg 37984
 tatgttttagt agagacaggg tttcaccatg ttggtgaggc tggctctgat tctccgcct 38044
 cagcctccca aagtgcctggg attacaggct tgagccaccg tgccctggctt tttttttttt 38104
 tttttttttt gtggcaataa ggtctcattg tcttgcccag gctagcctta tgctcctagc 38164
 ctcaagtgat cctcctccct cagcctccca aagtgcctggg attacagggtg ggcgccactg 38224
 tgccctgttcc cgttgggagg tcttttccac cctctttttc tgggtgcctc ctctggctca 38284
 gccgcacct gcaggatgac acaaggggat ggggaggcac tcttggttcc atcgacgggt 38344
 cccctctgac cccctgaact cgctccccgg acccccag gc tcc atc gcc tac ctc 38399
 ly ser ile ala tyr leu
 375 380
 ttc ttc acc aac cgg cac gag gtc agg aag atg acg ctg gac cgg agc 38447
 phe phe thr asn arg his glu val arg lys met thr leu asp arg ser
 385 390 395
 gag tac acc agc ctg atc ccc aac ctg agg aac gtg gtc gct ctg gac 38495
 glu tyr thr ser leu ile pro asn leu arg asn val val ala leu asp
 400 405 410
 acg gag gtg gcc agc aat aga atc tac tgg tct gac ctg tcc cag aga 38543
 thr glu val ala ser asn arg ile tyr trp ser asp leu ser gln arg
 415 420 425
 atg atc tgc ag gtgagcgtcg cccctgcctg cagccttggc ccgcaggatga 38594
 met ile cys se
 430

gatgagggct cctggcgctg atgcccttct ctccctctgc ctacg c acc cag ctt 38649
 r thr gln leu
 435

gac aga gcc cac ggc gtc tct tcc tat gac acc gtc atc agc aga gac 38697
 asp arg ala his gly val ser ser tyr asp thr val ile ser arg asp
 440 445 450

atc cag gcc ccc gac ggg ctg gct gtg gac tgg atc cac agc aac atc 38745
 ile gln ala pro asp gly leu ala val asp trp ile his ser asn ile
 455 460 465

tac tgg acc gac tct gtc ctg ggc act gtc tct gtt gcg gat acc aag 38793
 tyr trp thr asp ser val leu gly thr val ser val ala asp thr lys
 470 475 480

ggc gtg aag agg aaa acg tta ttc agg gag aac ggc tcc aag cca agg 38841
 gly val lys arg lys thr leu phe arg glu asn gly ser lys pro arg
 485 490 495



























gcc atc gtg gtg gat cct gtt cat gg gtgcgtatcc acgacgctga 38887
 ala ile val val asp pro val his gl
 500 505

gggctgcaga gggaatggag ggagcaggaa ggagcttcag gaactgggta gtgggctggg 38947
 catggtggct caaagcacct gtaatccag cactttggga ggccaagggtg ggtggatcat 39007
 caagaccagc ctgaccaaca tggtgaaacc tcgtctctac taaaaatata aaaattagcc 39067
 ggggtgtggtg gtgggcacct gtaatccag ctgctcggga ggctgaggca ggagaatcac 39127
 ttgaacctgg gagatggagg ttgcagttag ccaagacagc cccactgcac tccagcctgg 39187
 gtgacagagt gagactccgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa ctaaacaaaa aactgggttag 39247
 tggctagaca acaggatggt atcttccaag cccatggctg actcagcagc tccctgggtca 39307
 agacactgtg acctgtgtcc cctggcagga agcatcgccc ctgccacctg cccgggtgtac 39367
 tctgtacctg tcaggtgaca tctgtacct aagcacgtga gaggtggcat ttcacagttt 39427
 cagtgtggtg ctgacaaccc gggacgcaca ctgtccttgc agctacaatc aggaggtgaa 39487
 tgttgggttt ccagcagaga aactgggaga aggcacactt ggtgtctgga agggaaaagc 39547
 agggaaagaga gcatcatcag atgootgogg gtgaagggtg gcccgctatg gccagcgtcc 39607
 ctttttattt ttatttattt atttatttga gatggaatct cgctctgtcg cccagactgt 39667
 agtgcagtgg tgcgatcacg gctcactgca agctccgct cacaggttca cgccattctc 39727
 ctgootcagc ctcccagta gctgggacta caggcaccgc ccaccacgcc cggttaattt 39787
 tttgcatttt tattagagac ggggtttcac cgcgttagcc aggatggtct aaatctcctg 39847
 accctgtgat ccacccgcct cggcctccct aagtgttggt attacaagcg tgagccacca 39907
 cgccccggccc cctttttatt ttttttttt tgagacggag tctcgctctg tcgcccaggc 39967
 tagattgcag tggcgtgacg tcggtcact gcagcctccg cctcccaggt tcaagtgatt 40027
 ctctgcctc aacctcccaa ctaattagga ttacaagcat gtaccacat gcctgactaa 40087
 ttttttgtat ttttagtaga gactgggttt caccatgttg gctagggttg tctcgaaccc 40147
 ttagcctcaa gtaatctgcc tgcctcagcc tcccaaacag cggggattac aggcattgagc 40207
 cactgtgccc aacccaaccc tggatctctt ttaaacaaga caatgctcgc tgttgccaca 40267
 gaacaatggg tggggtacat gtggcccagt gtgtttggcc acataactgc caggccagag 40327

ggaaagagac tctcagactg tctccactca gatacaaatg tgtgtgttgt gtgctgttgt 40387
 tctgggtctca tatttgtttg ttttgagaca ggggtgtcgt ctgtcactga gtctggagtg 40447
 cagtggcgca atcagagttc actgcagcct caaactcttg ggctcagttg attctccac 40507
 ttcagcctcc caagtagctg gaactacagg tgaacaccac tgtgccagc taatttattt 40567
 tatttttagt agagatgagg tctcactatg ttgccaggc tggctctgac ctctagcct 40627
 caagcaatcc tcctgccttg gtctccaaa gtgctgggat tacacgtgcg agccattgcg 40687
 catggcttgt gttcttgtgt ttcttctttt ttctttcgag atggcgtctc agtctgccac 40747
 ccaggctgga gtgcagtggg gtgatcatag ctactgtag cctcaacttc ctgggctcaa 40807
 gcaatcctct tgatttcagc ctcccgggcc tggccagcat ggtgaaccac cgtctctact 40867
 aaaaatacaa aaatgtagcc aggcgtgggt gtgggcgcct gtaatccag ctacaccaga 40927
 ggctgaggca ggagaatcgc ttgagcctgg aagggtggagg ttgcagcaag ccaagatcgt 40987
 gccactgcac tccagcctgg gcaacagaga cagactctgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa 41047
 acccaaaaaa gccacatttg gagtttgggg ttcccagcag gactatttcc caagcctgag 41107
 cctggctgtt tcttccagaa ttcgttgac gcattggctg ggatcctccc ccgcctcca 41167
 gcctcacagc tatctctgt cctcccacca g c ttc atg tac tgg act gac tgg 41220
 y phe met tyr trp thr asp trp
 510 515
 gga act ccc gcc aag atc aag aaa ggg ggc ctg aat ggt gtg gac atc 41268
 gly thr pro ala lys ile lys lys gly gly leu asn gly val asp ile
 520 525 530
 tac tcg ctg gtg act gaa aac att cag tgg ccc aat ggc atc acc cta 41316
 tyr ser leu val thr glu asn ile gln trp pro asn gly ile thr leu
 535 540 545
 g gtatgttcgc aggacagccg tcccagccag ggccggggcac aggctggagg 41367
 a
 acagacgggg gttgccaggt ggctctggga caagcccaag ctgctccctg aaggtttccc 41427
 tctttctttt ctttgttttt tctttttttg agatgaggtc ttggtctgtc acccaggctg 41487
 gagtgcaactg gcgcaatcgt agctcactgc agcctccacc tcccaggetc aagtgatcct 41547
 cctgcctcac cctcctgagt agctgagatt acagacacgt gccaccacgg cagactaatt 41607
 ttattttatt tttgggaaga gacaaagtct tgttatgttg gcctggctgg tctcaaactc 41667
 aggggtgcaag cgatcctccc gcctcagcct tccaaactgc tgggattaca ggcgtgggcc 41727
 acogtaccca gcctccttga agtttttctg acctgcaact cccctacctg cccattggag 41787
 agggcgtcac aggggagggg ttcaggctca catgtgggtg gagctgcctc tccagggtgct 41847
 tttctgctag gtccctggca ggggtcttc ctgccggag cagcgtggcc aggcctcag 41907
 gacctctgg gactggcatc agcacgtgac ctctccttat ccacttgtgt gtctag 41963
 at ctc ctc agt ggc cgc ctc tac tgg gtt gac tcc aaa ctt cac tcc 42010
 sp leu leu ser gly arg leu tyr trp val asp ser lys leu his ser
 550 555 560
 atc tca agc atc gat gtc aac ggg ggc aac cgg aag acc atc ttg gag 42058
 ile ser ser ile asp val asn gly gly asn arg lys thr ile leu glu
 565 570 575

gat gaa aag agg ctg gcc cac ccc ttc tcc ttg gcc gtc ttt gag 42103
 asp glu lys arg leu ala his pro phe ser leu ala val phe glu
 580 585 590

gtgtggctta cgtacgagat gcaagcactt aggtggcgga tagacacaga ctatagatca 42163
 ctcaagccaa gatgaacgca gaaaactggt tgtgactagg aggaggtcctt agacctgagt 42223
 tatttctatt ttcttctttc tttttttttt tttttttgag acagagtttt gctctcgttt 42283
 cccaggctgg agggcaatgg catgatctcg gctcaccgca acctccacct cccaggttca 42343
 agtgattctc ctgtctcagg ctccccagta gctgggatta caggcatgca ccaccacat 42403
 gcccggttaa ttttgtattt ttagtagaga cggagtttct ccatgttggt caggctggtc 42463
 tcgaactccc gacctcaggt gatctgcctg cctcggcctc ccaaagtgtt gggattacag 42523
 acttgagcca ccgcgccag ctatttctgt tttctttctt tcttcttctt cttttttttt 42583
 ttctaagaga caggatctca ctctgtcccc aggcaggagt gcagtgtgt gatcatagct 42643
 cactgcagcc ttaacctcct gggtcaagt gatcttccca cctcagcctc ccaagtagct 42703
 ggaactacag gtgcacacca ccatgccag ctcatttttg tttttttttt ttttttgaga 42763
 cagtctcgtt ctgtcacccc ggctggagt cagtggtaaca atcttggtc actgcaacct 42823
 ctgcctccca ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc tgagtagttg agattacagg 42883
 catgtgtgcc atcatacctg gctgattttt gtattttttt ttagagatgg ggtctcagta 42943
 tgttgaccag gcttgtctta aactcccgcc ctcaagtgat cctccactt cagtctccca 43003
 aagtgtggg attacaggca tgagccactg cggccgggtt gttttctttt ttttttctgt 43063
 ttttgagac ggaatttcac ctttgttgcc caggatggag tgcaatggca cgatatcgcc 43123
 tcaccacaac ctctgcctcc tgggttcaaa ccattttcct gcctcagcct tcttagtagc 43183
 tgggattaca agcatgtgcc accacgccc gctgattttg ttttttagt agagatgggg 43243
 tttctccatg ttggccaggc tgggtctgaa ctctgacct caggtcattc gccacctct 43303
 gcctcccaaa gtgtgggat tacaggcgtg agccaccgtg cccggtgggt tgtattcttt 43363
 ttactgagag tctgaaaagg cagtgatcct ctgtcacatg tgatcttggc tctcagggga 43423
 catttgcaa tttctagaga ttttttggtt gtcacaagtc aatggggaag actgttgga 43483
 tttagtgggt agaggtggt gacgtgtgt aacaccaga acagggaagt agcaggccct 43543
 agatagagcc atcgtgggga aacctgtct taaggaaatg gcgctatttt ataaccacac 43603
 gttcctggca tgattacca cagccaaaag tggagtcccc ccaagtgtgt tcttccattt 43663
 gcattgcagt aaaggaatag ctgaggccgg gtaatttata aagaaaagag atttaaactg 43723
 ggtatggcag tttatgccta taatcccaga actttgggag gctgaggcag gaggatcgt 43783
 tgagtccagg agtgtgagac cgagaccagc ctggccaaca tgacgaaact ctgtctctac 43843
 aaaaaataca aaaagtaggc caggcacggt ggttcacgcc tgtaatccca gcactttggg 43903
 aggccgaggc gggcggtatca cgaggtcagg agatcgagac catcctgggt aacacggtga 43963
 aacctcgtct ctactaaaaa tacaaaaaca aaattagccg ggtgtggtgg caggcgctg 44023
 tagtccagc tactcgggag gctgaggcgg gagaatggcg tgaaccggg aggcggagct 44083
 tgacgtgagc caagatcgcg ccaactgact ccagcctggg tgaccgagtt gagactcgt 44143
 ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaataca aaaagtagcc aggtgtggtg gcaggcacct 44203
 gtaatcctgg gttctcgaga ccgaggcatg agaattgcct gacccagga ggtggaggct 44263
 gcagtgagcc aagatcatgc cactgcactc cagcctgggc gacagagtgg gactctgtct 44323
 caaaaaacaa caaaaaaaa gttctgaaa tggatggtg tgatggtgat acttccacaa 44383
 cagcgtgaat ctgcttaagg ccaccgaact gtgcactcac aaatagtcga gatggtacat 44443

tctttatttt tttcttttga gatttgctgt caccagcct ggaatgcagt ggtgccatct 45967
 tggctcactg ctacctctcc cactgggttc aagcaattct cctgcctcag cctcccaagt 46027
 agctgggatt acaagcatgc gccacatgc ctggctaagt tttgtatfff tagtacagac 46087
 agggttttct catgggtggcc aggtctgtct tgaactcctg acctcaggtg atcctccac 46147
 ctctgcctcc cgaagtgcta cgattacagg catgagccac cgcgcccatc cccctttgtt 46207
 gactttttct atcctctgag aaagtctcag ttgaggccag cacctccctc aagtgaattg 46267
 aatctccctt ttgaacaaca acaataaca atatgaccca gacgtggtgg ctcacacctg 46327
 tggctccagc tactcgggag gctgaggtgt gaggattgct tgagcccagg aggtcaaggc 46387
 tacagagagc tataatcaca ccacttcact ccagcctggg ggacaaagtg aaaccctgtc 46447
 tgaaaaaaac aaaaaaagaa aaaggaaaaa gaaacaatac gatcacaag tagatattca 46507
 tagtgtttat tttcagtact cttttttttt tttttttttt tttttgagac ggagtcttgc 46567
 tctgttgccc aggtctggagt gcagtggcac gatcttggt cactgcagcc tctgcctccc 46627
 aggttcaagc gcttggetca ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcgc ttcttctgcc 46687
 tcagcctccc cagtagctgg gactatagga acgtcccact acgcccagct aattttttgt 46747
 attttttagt agagatgggg tttcactatg ttagccagga tggctctgat ctctgacct 46807
 cgtgatctgc ctgccttggg ctcccaaagt gttgggatta tgggcatgag ccactgcacc 46867
 tggccttttt tttttttttt tttgagatgg agtttcgctc ttgttgccca ggctggagtg 46927
 caatgggtgt atctcggtc actgcaacct ctgcctcctg ggttcaagca attctcctgc 46987
 ctcagcctcc cgagtagctg ggattacagg cacctgccac cagcctggc taatttttgt 47047
 acttttagta gagacgggtt ttctccatgt tggtcaggct ggtctcaaac tcctgacctc 47107
 aggtgatcca cccacctcg cctcccaaag ttctgggatt acagacatga gccaccgcgc 47167
 ctggcctgt ctggcctttt ttagttatft cttttttttt tttttttttt tttgagacag 47227
 agtcttactc cgtcgcccag gctggagtgc agcggtgca tgtctgcga ctgcaagctc 47287
 cgcctcctgg gttcatgcca ttctcctgcc tcagccttct gactgagctgg gactgcaggc 47347
 gcctgccact acgcccggct acttttttgt atatttagta gagatggagt ttcactgtgt 47407
 tagccaggat ggtctcgatc tcctgacttt gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaagtg 47467
 ctgggattac aggcgtgagc caccatgcca ggcttttttt tttttttttt tttttgagac 47527
 ggagtcttgc tctgtcgccc aggtctggagt gcagtgccat gatctcagct cactgcaagc 47587
 tccacttccc aggtctacgc cattctccag cctcagcctc ccaagtagct gagactacag 47647
 gggcccgcca ccacactcgg ctaatttttt tgtattttta gtagagacgg ggtttcacca 47707
 tgttagccag gctggtcttg aactcctaac ctcaggcgat tcacctgcct cggcctccca 47767
 aagtgtcggg attaaaggta tgagccacct cgcctgggtg gagccacctc gccagacctg 47827
 agccacctca cccagcctaa gccactgtgc ctggcctgat tttggacttt ttaaaaattt 47887
 tattaataat tatttttggg tttctttttt ttgagacagg gtcttactct gtcattccagg 47947
 ccatcctgtc tgtctgtcat cccagtgatg ggatcatacc ttgctgcagc ctctacctcc 48007
 tgggctcaag cgatcctccc cctcagcct cctgagtagc tgggagtaca ggtgtgcacc 48067
 accacacctg gctaattttt tttttttttt ttgtatatag agatggtatt ttgccatgtt 48127
 gaccaggcta gtcttaaaact cctggactca ctcaagagat cctcctgcct tggcctccca 48187
 aggtcatttg agactttcgt cattaggcgc acacctatga gaaggcctg caggcacgtg 48247
 gcactcagaa gacgtttatt tattctttca g ag gct gag gct gca gtg gcc acc 48301

lu ala glu ala ala val ala thr

tgggtggctca tgccctgtatt cacaacacct tgggaggcaa aggtgggcag atcacttgag 50359
gtcaggaggt cgagactagc ctggccaaca tggtgaaacc cctgtctac taaaaaata 50419
caaaaattac ctgggcacag tgggtgggtgc ctgtaatccc agctacttgg gatgctgagg 50479
gtggagaatt gcttgaacct gggaggcaga agttgcagta agccaagatc atgccactgg 50539
actccagcct cagtgcacaga gcaaaactct gtctccaaaa aaattgtttt tttttttttt 50599
ttttc aaatc atcacactac agccaaggcc tggccactta cttttgtaaa taaagtttta 50659
ttggagccag tggaccagtg aggcogaatc ttgcagggtg aagatcacag tctatccttg 50719
aaaattttga tattttgttc attgggtgggt ttttcattaa tttaaatttt aaaaaataac 50779
atattaaagg ctggtgtgga ggtgcacgcc tgcagtccta gctactccca gaggctgagg 50839
cgggagactt gcttgagccc aagagttgaa gtccagcctg ggcaacatag cgagaccccc 50899
atctctaaaa ataaaaataa tgcattagaa tattattgga ttccctgggca gggcacagt 50959
gtcacacact gtaatcccag cactttggga ggctgaggtg ggtggatcac ctgaggtcag 51019
gagtttgaga ccagcctggc caacatggtg aaaccccgtc tctactaaaa atacaaaaat 51079
tagccaggcg tgggtggcagg tgccctgtaat ccagctact cgggaggctg aagcacgaga 51139
atcgcttgaa tccaggaggc ggaggttgca gtgagctgag attgcgccat tgcactccag 51199
cctggaggac aagagtga aa ctccattccc ctctgcaaag aaaaggaata ttatcagatt 51259
cctaagcttt ttggtcctcc ctttagtttg ggggctgggg tggtgagtgt ctgacctggc 51319
ctcactgtcc tccctggatg tgatgagacc caggtgtggg tcaggatgtc attcgtttgt 51379
ccaccagagg ggcgccaaac tgctttgagc tgctgggaaa tgggtgctcct agacttttag 51439
caaacaaaca aaaaaaatg gcacatcggc aaatttcaga ccattctttt tttttttttt 51499
tttggttcca gagtagctga aatctttgtt cagttacaag caggataaaa tggaaactgc 51559
ctgggagagg ctgagaaacc ttcttgcttg ggggaggtgg ggcactgcta gaattaatcg 51619
cttcacagac cagcccatcc aggactcctc aaatttggca aaaaagccat tcattcattc 51579
attcatttat gtagagacga gggggatctg gctatattgc ctagattggt ctcaaattcc 51739
tggcctcaag tgatcctcct gccttggctc actaatgtgc tgcgattaca ggcattgagc 51799
accgtgccta gctctagtgg acttgaaatg ttgccttgcc cagggccctt atgttgaatg 51859
gcccaggctc acttgatatg ttctgtacca aggttaaccc catcccataa tgccctgggac 51919
agttgatgca ggacaatcag cttctgtgcc attcaacctc aggactgagc atgctgggca 51979
ttgtggggct cgaaggtggc tcccctgtcc ccttcaaaat accctctttt tctttctctc 52039
tttttttttt tttttttttt ttgagacgaa gtcttgctct gttgccccag ctagagtgca 52099
gtggtgcgat ctcagctccc cgcaacctct gcttccccggg ttccaggcgat totcctgcct 52159
cagcctcctg agtagctggg attacaggtg cccaccgcca cagctggcta atttttgtat 52219
ttttagtaga gacagggttt caccgtgttg gccaggctgg tottgaactc ctgacctcag 52279
gcaacctgcc cactcagcc tcccaaagt ctgggattac aggtttgagc cactgggcct 52339
ggcctttttt tttttttttt gagagggagt ctcactctgt tgcccaggct ggagtgcaat 52399
ggcgcgatct tgactcactg caactccatt tcccgggttc aagtgattct cctccctcag 52459
cctcccaagt agctgggatt acaggtgcat gccaccacgg ccagctaatt ttgtattttt 52519
agtagagaca gggtttctact atgttgatca tgctggtctc aaactcctga ccttaggtga 52579
tctgcccgcc ttagcctccc aaagtgttgg gattacaggt gtgagccacc ggcgccagac 52639
caaaatatgc tcattttaat aaaatgcaca agtaggttga caagaatttc acctgcaacc 52699
ttgtcaacca cctagaataa aagcctctgc agccctcccc taaagactca tcaatgtgag 52759
gctcaagaac cttcttaggc tgggctcggt ggctcatttc tgtaatccct gcactttgga 52819

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....

aggctgaggc aggaggatct cttgaggcca ggagttcaag acaagcctgg gcaacatagc 52879
cagacctctg tttctatccc ccacaaaaag aaccttctta aaccggaatt gagtcctaca 52939
acctcgataa ctcacaaata agcccgtgtg gectctcaca gacttgggaa gttctccaag 52999
tgtccagggg gatgtgccag gcgctttcct gccgtgacca ccgtcctctg cctgctccat 53059
ttcttggtgg ccttccttta gacctgggcc tcaactcttg tctctcctg cag ct ctg. 53117
la leu
750
ggc gac gtt gct ggc aga gga aat gag aag aag ccc agt agc gtg agg 53165
gly asp val ala gly arg gly asn glu lys lys pro ser ser val arg
755 760 765
gct ctg tcc att gtc ctc ccc atc g gtaagcgcg gccgggtcccc 53210
ala leu ser ile val leu pro ile v
770 775
cagcgtcccc caggtcacag cctcccgtta tgtgacctcg tgccctggctg gttgggcctg 53270
ttcacttttt ctctggaca gggaacagcc cactgggtgt cctttatcac cccacaggcc 53330
tctcctggct tggggctgac agtgacaaga tcagacagct aaggggtcag atggaggatg 53390
tggagctggg tcccgtgctg tggaatagcc tcaccgagat ttgagtgcct tctggggaac 53450
tggttccctt gcagggggct gtgtggagag gcgcgctctc cctgcctcac ccagtctcat 53510
cctaactcgg ttaccatcac atctcttttt tcttttttct ttaaatttta agaaaaaaga 53570
aatttaattt ttttgagaga cagagtcttg ctctgtcacc caggctggag tgcagtggca 53630
ccatcatgcc tcgtgcagc ctcaatgtct gggctcaagc gatcctcca cctcagcctc 53690
ctgagtagct ggtgcaagcc actatacccc acttcctatt tcttaaaaag tcacagccct 53750
gtgtgtggct aatcctggac agaaatctag aagaagtcag ctacttctgg ggcgtggctc 53810
accagtgagg cttcagggtta gatatttctt atacttatga ggctgggtgt ggtggcttat 53870
gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga agtgggtgga ttgcttgggc tcaggagtcc 53930
gagaccaacc tgggcaacat ggcgaaaccc tgtttctaga aaaggtacaa aaattagctg 53990
ggcaggtggc acgtgcctgt ggtaccagct acttgagggc ctgaggcagg aggatcgctt 54050
gaacctggga ggtcgagggt gcaagtgaact gagatcatgt cactgcactc cagcctgggtg 54110
acagagcaag acccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaagaa aaaaattctt atgcatagat 54170
ttgcctcttt tctgtttgtt tgttttgaga tggagtctcg ctctgtcgcc caggctggag 54230
tacagtggct caacctcggc tcaactgcaac ctctgcctcc cgggttcaag caattctcct 54290
gcctcagcct cctgagtagc tgggactaca gcgcccgcca ccattgcccag ctaatttttg 54350
tatttttagt agagactgac tgggtttcat catgttggcc aggtctgtct cgaactcttg 54410
acctcatgat ccgcccgcct cagcctccca aaatgctggg attacaggcg tgagccacca 54470
ggcccaggcc gcaaggcgat ctctaaacaa acataaaaga ccaggagtca aggttatggt 54530
acgatgcccg tgttttcaact ccagccacgg agctgggtct ctggtctcgg gggcagctgt 54590
gtgacagagc gtgcctctcc ctacag tg ctc ctc gtc ttc ctt tgc ctg ggg 54642
al leu leu val phe leu cys leu gly
780
gtc ttc ctt cta tgg aag aac tgg cgg ctt aag aac atc aac agc atc 54690
val phe leu leu trp lys asn trp arg leu lys asn ile asn ser ile
785 790 795 800

aac ttt gac aac ccc gtc tat cag aag acc aca gag gat gag gtc cac 54738
 asn phe asp asn pro val tyr gln lys thr thr glu asp glu val his
 805 810 815
 att tgc cac aac cag gac ggc tac agc tac ccc tcg gtgagtgacc 54784
 ile.cys his asn gln asp gly tyr ser tyr pro ser
 820 825
 ctctctagaa agccagagcc catggcggcc cctcccagc tggaggcata tgatcctcaa 54844
 gggaccaggc cgaggcttcc ccagccctcc agatcgagga cagcattagg tgaatgcttc 54904
 tgtgcgctca ttcagaatgt cagcggacaa tggccttggt ggtgtagagg aatgttggtat 54964
 aagcaaatag agagctccat cagatggtga cagggcaaag aaagtcaaaa ggagttcaga 55024
 ggccggggcg ggtggctcat gcctgtaatc ccaggacttt gggaggccga ggctggcgga 55084
 tcactgaag tcaggagttt gagaccagct tggccatcat gacaaaaccc cgtctctatt 55144
 aaaaatacaa aaaattagcc aggcgtggga gtgggcgcct gtaatcccag ctactcgga 55204
 ggccgaggtg gaaaaatcgc ttgaacctag gaggcagagg ttgcagttag ccgagatcgc 55264
 gccactgcat tccagccggg gaggcaagag caaaactcca tctcaaaaaa aaaaaaaaaa 55324
 ggagttcaga ggcccggcat ggtggttcac acatgtgatc ccagaacttg gggaggttga 55384
 ggcaggagaa tcacctgagc tcagagttca agaccagcct gggcagcaca gcaagacccc 55444
 atctctgcaa aaaataaaaa tttagcccag tgtggtgatg agcgcctagt tccagctact 55504
 agggaggcta aggcaggagg attgcttgag gctaaggtag gagattgaga ctgcagtgac 55564
 ttgtgattgc gtcactgccc tccagcctgg gtgacagagc aagcccttgt ctcttaaaaa 55624
 aaaaaaaaaa ttcaaagaag ggtttccaga gggccaggag ggaggaaggg agaggagggtg 55684
 ttttattttt ttgcttttat tttttatttt gagacagagt ctctctctgt caccaggtt 55744
 ggagtgcagt gctgtgatct tggctcactg caacttctgc ctctgggtt caagcaattc 55804
 ttatgcctca gcctcagcct cctgagtagc tgggattaca aactatgccc cgggtaattt 55864
 ttgtattttt agtagagagc aggtttcgcc atgttgccca gactggtctc gaactcctga 55924
 cctcaagtga tccacccgcc ttggcctccc cacgtgctgg gattgcaggc gtgagccact 55984
 gcgcccgcct tgatctttac acaaggggtt tagggtaggt agccttctct gaaccaggag 56044
 aacagcctgt gcgaaggccc tgaggctgga ccgtgcctgt tgggtttgag gccgttgtag 56104
 ctggagcaaa cagagagagg ggtaaaaagg caggaggcta ccaggcaggt tgtgcagagc 56164
 cttgtgggcc actggggagg actttggctt ttgcctgag agcggtgga agtgactgaa 56224
 tccggtactc accgtctccc tctggcggtc cctgggggaa catgcttggg gatcaggctg 56284
 ggggaggctg ccaggcccag gaggtgagaa gtaggtggcc tccagccgtg tttcctgaat 56344
 gctggactga tagtttccgc tgtttaccat ttgttggcag aga cag atg gtc agt 56399
 arg gln met val ser
 830
 ctg gag gat gac gtg gcg tgaacatctg cctggagtcc cgtccctgcc 56447
 leu glu asp asp val ala
 835 839
 cagaaccctt cctgagacct cgccggcctt gttttattca aagacagaga agaccaaagc 56507
 attgcctgcc agagctttgt tttatatatt tattcatctg ggaggcagaa caggcttcgg 56567
 acagtgccc tgcaatggct tgggttggga ttttggttc ttcctttcct cgtgaaggat 56627
 aagagaaaca ggcccggggg gaccaggatg acacctccat ttctctccag gaagttttga 56687

ctcggtcac tgcaagctct gctcccagg ttaatgocat tctcctgtct cagcctcctg 59267
agtagctggg gccacaggcg cctgccacca cgcccggtta attttttttt gtacttcttt 59327
tagtacagac ggggtttcac catgttagcc aggatgggtct cgatctcctg accttgtgat 59387
ccacctgctt cggcctccca aagtgtgag attacaggcg tgagccaccg cgggtggcca 59447
acgctaattt ttttgtttt ttagatggag tottgctctg tcgccaggc tggagtgcag 59507
tggcgtgate tctgcctact gcaagctcgg cctcccggt tcatgccatt ctctgcctc 59567
agcctcctga gtaactggga ctacaggcac cgccaccac gcccggttaa ttttttgtat 59627
ttttagtaga gacagggttt caccgtgtta gccaggatgg tottgatctc ctgaccttgt 59687
gatccaccgg tctcggcctc ccaaagtgt gggattagag gtgtgagcca ccacacctgg 59747
cctagcctgg ctaatttttg tatttttggg agagacgggg ttccaccatg ttggtcaggc 59807
tgggtctgaa cttctgacct caggtaatct gctgcctca gtctcccaa gtgctgggat 59867
tacagggtgtg agccaccgg cctggcctca ctctctctg tcatctgttt gtggattgga 59927
ctcccagga gaaggacca gaagggaag actccagaa ctccgggcaa gatgcaatct 59987
ccgtgggctg cca 60000

<210> SEQ ID NO.: 2

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex1F

<400>

cacattgaaa tgctgtaaat gacg

<210> SEQ ID NO.: 3

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex1R

<400>

ctattctggc gcctggagca agcc

<210> SEQ ID NO.: 4

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex2F

<400>

ttgagagacc ctttctcctt ttcc

<210> SEQ ID NO.: 5

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex2R

<400>

gcatatcatg cccaaagggg

<210> SEQ ID NO.: 6

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex3F

<400>

ttcctttgag tgacagttca atcc

<210> SEQ ID NO.: 7

<211> 24

<212> polinucleótido

...

...

...

...

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex3R

<400>

gataggctca atagcaaagg cagg

<210> SEQ ID NO.: 8

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut191-2F

<400>

acagttcaat cctgtctctt ctct

<210> SEQ ID NO.: 9

<211> 10

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex4AF

<400>

gtggtctcgg ccatccatcc

<210> SEQ ID NO.: 10

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

...

...

...

...

<223> Ex4ARF

<400>

agccatcttc gcagtcgggg

<210> SEQ ID NO.: 11

<211> 12

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut 509insCR

<400>

cgagccatct tcgcagtcgg ag

<210> SEQ ID NO.: 12

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex4BF

<400>

ccccagctg tgggcctgcg

<210> SEQ ID NO.: 13

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex4BR

<400>

cgccccacc ctgccccgcc

...

...

...

...

<210> SEQ ID NO.: 14

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex6F

<400>

tctctcttcc tctctctggc

<210> SEQ ID NO.: 15

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex6R

<400>

tctgcaagcc gcttgcaccg

<210> SEQ ID NO.: 16

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> MutC255GF

<400>

ctctggctctc acagtgcac gc

<210> SEQ ID NO.: 17

<211> 20

<212> polinucleótido



<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut E291XR

<400>

gcaccgagac tcaccgcaat

<210> SEQ ID NO.: 18

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex7F

<400>

ggcgaaggga tgggtagggg

<210> SEQ ID NO.: 19

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex7R

<400>

gttgccatgt caggaagcgc

<210> SEQ ID NO.: 20

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<223> Ex9F

<400>

cccctgacct cgctccccgg

<210> SEQ ID NO.: 21

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex9R

<400>

gctgcaggca ggggcgacgc

<210> SEQ ID NO.: 22

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex10F

<400>

atgcccttct ctctcctgc

<210> SEQ ID NO.: 23

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex10R

<400>

agccctcagc gtcgtggata

5'

3'

5'

3'

<210> SEQ ID NO.: 24

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut1432delGF

<400>

gggacatcca ggcccccgcc

<210> SEQ ID NO.: 25

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex11F

<400>

tcctcccccg ccctccagcc

<210> SEQ ID NO.: 26

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex11R

<400>

gctgggacgg ctgtcctgcg

<210> SEQ ID NO.: 27

<211> 20

<212> polinucleótido

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex13F

<400>

gtcatcttcc ttgctgctg

<210> SEQ ID NO.: 28

<211> 30

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex13R

<400>

ttccacaagg aggtttcaag gttggggggg

<210> SEQ ID NO.: 29

<211> 13

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> MutH635NR

<400>

acctcttggc tgggtcaggt tct

<210> SEQ ID NO.: 30

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex14F

<400>

aaattttctgg aatcttctgg

<210> SEQ ID NO.: 31

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex14R

<400>

gcagagagag gctcaggagg

<210> SEQ ID NO.: 32

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut2140+1G>AR

<400>

gaaacaaggc gtgtgccaga

<210> SEQ ID NO.: 33

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex15F

<400>

gaagggcctg cagcâcgtgg ca

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<210> SEQ ID NO.: 34

<211> 19

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex15R

<400>

tagggagggc ccagtccttt

<210> SEQ ID NO.: 35

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex17F

<400>

gggtctcttg tctcgggggc

<210> SEQ ID NO.: 36

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex17R

<400>

ggctctggct ttctagagag gg

<210> SEQ ID NO.: 37

<211> 23

<212> polinucleótido

5'

3'

5'

3'

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggtcggga cactgcctgg cag

<210> SEQ ID NO.: 38

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggtcggga ccctgcctgg cag

<210> SEQ ID NO.: 39

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgccaggca gtgtcccgac ccg

<210> SEQ ID NO.: 40

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgccaggca ggggtcccgac ccg

...

...

...

...

<210> SEQ ID NO.: 41

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atgcatttcc cgtcttggca ctg

<210> SEQ ID NO.: 42

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gatgcatttc cctcttggca ctg

<210> SEQ ID NO.: 43

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gatgcatttc ccgtcttggc actgg

<210> SEQ ID NO.: 44

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<400>

agatgcattt ccctcttggc actgg

<210> SEQ ID NO.: 45

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtctcttct gtagtgtctg tcacc

<210> SEQ ID NO.: 46

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtctcttctg tctgtgtctg tcacc

<210> SEQ ID NO.: 47

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

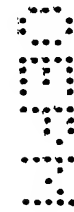
ctgtctcttc tgtagtgtct gtcacct

<210> SEQ ID NO.: 48

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

tgtctcttct gtctgtgtct gtcacct

<210> SEQ ID NO.: 49

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggccgtgtca accgtgcat tcc

<210> SEQ ID NO.: 50

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gccgtgtcaa ccgtgcatt c

<210> SEQ ID NO.: 51

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aggaatgcag cgtttgacac ggccc

<210> SEQ ID NO.: 52

<211> 27

5

5

5

5

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaggaatgca gcgtttgaca cggcccc

<210> SEQ ID NO.: 53

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgtgggg gccgtgtcaa ccg

<210> SEQ ID NO.: 54

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgtgggg gcgtgtcaac cgc

<210> SEQ ID NO.: 55

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggttgacac ggccccca gct

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<210> SEQ ID NO.: 56

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggttgaca cgccccaca gct

<210> SEQ ID NO.: 57

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaggctgtc gtaagtgtgg c

<210> SEQ ID NO.: 58

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcaaggctgt cgtaagtgtg gcc

<210> SEQ ID NO.: 59

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

<400>

caaggctgtc gttaagtgtg gcc

<210> SEQ ID NO.: 60

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aaggctgtcg ttaagtgtgg c

<210> SEQ ID NO.: 61

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggtgctca cctgtggtcc cgcc

<210> SEQ ID NO.: 62

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

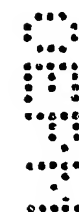
ccggtgctca cccgtggtcc cgcc

<210> SEQ ID NO.: 63

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial



<220>

<221> cebador

<400>

cggtgctcac ctgtgggtccc gc

<210> SEQ ID NO.: 64

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggtgctcac ccgtgggtccc gc

<210> SEQ ID NO.: 65

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacaacgacc ccgactgcga agatg

<210> SEQ ID NO.: 66

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacaacgacc cccgactgcg aagat

<210> SEQ ID NO.: 67

<211> 23

.....
.....
.....

.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaacgaccc cgactgcgaa gat

<210> SEQ ID NO.: 68

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaacgaccc ccgactgcga aga

<210> SEQ ID NO.: 69

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggccactc atccgagcca tct

<210> SEQ ID NO.: 70

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggccactc acccgagcca tct

...

...

...

...

<210> SEQ ID NO.: 71

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcgggccact catccgagcc atctt

<210> SEQ ID NO.: 72

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcgggccact caccgagcc atctt

<210> SEQ ID NO.: 73

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccagctggcg ctgtgatggt ggc

<210> SEQ ID NO.: 74

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

5

5

5

5

<400>

ccagctggcg ccgtgatggt ggc

<210> SEQ ID NO.: 75

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tccagctggc gctgtgatgg tggcc

<210> SEQ ID NO.: 76

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tccagctggc gccgtgatgg tggcc

<210> SEQ ID NO.: 77

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgcaaggac aaatctgacg aggaa

<210> SEQ ID NO.: 78

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

...

...

...

...

<220>

<221> cebador

<400>

ctgcaaggac aactgcggtg tgggc

<210> SEQ ID NO.: 79

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actgcaagga caaatctgac gaggaaa

<210> SEQ ID NO.: 80

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actgcaagga caactgcggt atgggcg

<210> SEQ ID NO.: 81

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaatctgac gaggaaaact gcggt

...

...

...

...

<210> SEQ ID NO.: 82

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaattctgac gacaaattctg acgag

<210> SEQ ID NO.: 83

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaaattctga cgaggaaaac tgcggta

<210> SEQ ID NO.: 84

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaaattctga cgacaaattct gacgagg

<210> SEQ ID NO.: 85

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

...

...

...

...

<400>

gggtccctcg cagagtgtca ctg

<210> SEQ ID NO.: 86

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gggtccctcg ccgagtgtca ctg

<210> SEQ ID NO.: 87

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgggtccctc gcagagtgtc actgt

<210> SEQ ID NO.: 88

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgggtccctc gccgagtgtc actgt

<210> SEQ ID NO.: 89

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

...

...

...

...

<220>

<221> cebador

<400>

aacccatcaa agagtgcggt gag

<210> SEQ ID NO.: 90

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aacccatcaa atagtgcggt gag

<210> SEQ ID NO.: 91

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaacccatca aagagtgcgg tgagt

<210> SEQ ID NO.: 92

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaacccatca aatagtgcgg tgagt

<210> SEQ ID NO.: 93

<211> 20

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcactctcgg gccctacca

<210> SEQ ID NO.: 94

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcactctcgg acccctaccc a

<210> SEQ ID NO.: 95

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cactctcggg cccctaccc

<210> SEQ ID NO.: 96

<211> 19

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cactctcgga cccctaccc

5

5

5

5

<210> SEQ ID NO.: 97

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acgagtgccct gtgcgccgac ggctt

<210> SEQ ID NO.: 98

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acgagtgccct gtacgccgac ggctt

<210> SEQ ID NO.: 99

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgagtgccctg tgcgccgacg gct

<210> SEQ ID NO.: 100

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

...

...

...

...

<400>

cgagtgcctg tacgccgacg gct

<210> SEQ ID NO.: 101

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgaagatgc gaaggtgatt ccgg

<210> SEQ ID NO.: 102

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcccagcga agatttccgg gtggg

<210> SEQ ID NO.: 103

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agcgaagatg cgaaggtgat ttccggg

<210> SEQ ID NO.: 104

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

...

...

...

...

<220>

<221> cebador

<400>

tggcccagcg aagatttccg ggtggga

<210> SEQ ID NO.: 105

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgaagaagag gtaggcgatg g

<210> SEQ ID NO.: 106

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggttggtga agacgatgga g

<210> SEQ ID NO.: 107

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgaagaaga ggtaggcgat gga

<210> SEQ ID NO.: 108

<211> 23

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggttggtg aagacgatgg agc

<210> SEQ ID NO.: 109

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctccatcgcc tacctcttct tcacc

<210> SEQ ID NO.: 110

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctccatcgcc taactcttct tcacc

<210> SEQ ID NO.: 111

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gctccatcgc ctacctcttc ttcaacca



<210> SEQ ID NO.: 112

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtccatcgc ctaactcttc ttcacca

<210> SEQ ID NO.: 113

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgccggttg tgaagaagag gtagg

<210> SEQ ID NO.: 114

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgccggttg gtgagaagag gtagg

<210> SEQ ID NO.: 115

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

...

...

...

...

<400>

gtgccggttg gtgaagaaga ggtaggc

<210> SEQ ID NO.: 116

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgtgccggtt ggtgagaaga ggtaggc

<210> SEQ ID NO.: 117

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caatagaatc tactggtctg acctg

<210> SEQ ID NO.: 118

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caatagaatc tagtggctctg acctg

<210> SEQ ID NO.: 119

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<220>

<221> cebador

<400>

gcaatagaat ctactggtct gacctgt

<210> SEQ ID NO.: 120

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcaatagaat ctagtggtct gacctgt

<210> SEQ ID NO.: 121

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcccccgac gggctggctg tggac

<210> SEQ ID NO.: 122

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcccccgac ggctggctgt ggact

<210> SEQ ID NO.: 123

<211> 25

...

...

...

...

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtccacagcc agcccgtcgg gggcc

<210> SEQ ID NO.: 124

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agtccacagc cagccgtcgg gggcc

<210> SEQ ID NO.: 125

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgggagttc cccagtcagt ccagt

<210> SEQ ID NO.: 126

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgggagttc cctagtcagt ccagt

.....
.....
.....

.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

<210> SEQ ID NO.: 127

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggagttcc ccagtcagtc cag

<210> SEQ ID NO.: 128

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggagttcc ctagtcagtc cag

<210> SEQ ID NO.: 129

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgtccccag aggatatggt tctct

<210> SEQ ID NO.: 130

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

...

...

...

...

<400>

ctgtccccag agaatatggt tctct

<210> SEQ ID NO.: 131

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccccaga ggatatgggt etc

<210> SEQ ID NO.: 132

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccccaga gaatatgggt etc

<210> SEQ ID NO.: 133

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tggttctctt ccacaacctc acc

<210> SEQ ID NO.: 134

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

.....
.....
.....

.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....

<220>

<221> cebador

<400>

tggttctctt caacaacctc acc

<210> SEQ ID NO.: 135

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atggttctct tccacaacct caccc

<210> SEQ ID NO.: 136

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atggttctct tcaacaacct caccc

<210> SEQ ID NO.: 137

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gctgaccttt agcctgacgg tggat

<210> SEQ ID NO.: 138

<211> 25

...

...

...

...

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgacctt tagctgacgg tggat

<210> SEQ ID NO.: 139

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgacctt tagcctgacg gtggatg

<210> SEQ ID NO.: 140

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gagctgacct ttagctgacg gtggatg

<210> SEQ ID NO.: 141

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgctcctcgt cttcctttgc ctg

5

3

5

3

<210> SEQ ID NO.: 142

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgctcctcgg ggtcttttggc tgg

<210> SEQ ID NO.: 143

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgctcctcg tcttcctttg cctgg

<210> SEQ ID NO.: 144

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgctcctcg gggctctttgc ctggg

<210> SEQ ID NO.: 145

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<400>

gactcacagc acgtctcctg ggact

<210> SEQ ID NO.: 146

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gactcacagc acatctcctg ggact

<210> SEQ ID NO.: 147

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actcacagca cgtctcctgg gac

<210> SEQ ID NO.: 148

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actcacagca catctcctgg gac

<210> SEQ ID NO.: 149

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

.....
.....
.....

.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

<220>

<221> cebador

<400>

ccatcgtggc agcgaaactc gtc

<210> SEQ ID NO.: 150

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atgcacttcc cacgtcctgg gag

<210> SEQ ID NO.: 151

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

catcgtggca gcgaaactcg t

<210> SEQ ID NO.: 152

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcacttccc acgtcctggg a

...

...

...

...

210> SEQ ID NO.: 153

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex8F

<400>

cattggggaa gagcctcccc

210> SEQ ID NO.: 154

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex8R

<400>

gcctgcaagg ggtgaggccg

210> SEQ ID NO.: 155

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex12F

<400>

actggcatca gcacgtgacc

210> SEQ ID NO.: 156

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex12R

<400>

cgtgtgtcta tccggccacc

210> SEQ ID NO.: 157

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex14F

<400>

aaattttctgg aatcttctgg

210> SEQ ID NO.: 158

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex14R

<400>

gcagagagag gctcaggagg

210> SEQ ID NO.: 159

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex16F

<400>

gcgcttttctt gccgtgacca

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

210> SEQ ID NO.: 160

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex16R

<400>

cctgtccagg agaaaaagtg aac

210> SEQ ID NO.: 161

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador MutI771TF

<400>

cagtagcgtg agggctctgt caa

210> SEQ ID NO.: 162

<211> 19

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Mut2389+4A>GR

<400>

ctgggggacc ggccggcgc

5'

3'

5'

3'

210> SEQ ID NO.: 163

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtcaagctg ggtgctgagg cag

210> SEQ ID NO.: 164

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtcaagctg gttgctgagg cag

210> SEQ ID NO.: 165

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtcaagctgg gtgctgaggc a

...

...

...

...

210> SEQ ID NO.: 166

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtcaagctgg ttgctgaggc a

210> SEQ ID NO.: 167

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggtcctcgc agagtgtcac tgt

210> SEQ ID NO.: 168

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggtcctcgc actgtgagag cca

210> SEQ ID NO.: 169

<211> 21

<212> polinucleótido

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtccctcgca gagtgctact g

210> SEQ ID NO.: 170

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtccctcgca ctgtgagagc c

210> SEQ ID NO.: 171

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccgtcggggg cctggatgtc t

210> SEQ ID NO.: 172

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

...

...

...

...

<400>

cccgtcgggg tctggatgtc t

210> SEQ ID NO.: 173

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccgtcgggg gcctggatgt etc

210> SEQ ID NO.: 174

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcccgtcggg gtctggatgt etc

210> SEQ ID NO.: 175

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggttggtg aagaagaggt aggcg

.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

<210> SEQ ID NO.: 176

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggttggtga agaaagaggt aggcg

<210> SEQ ID NO.: 177

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gccggttggt gaagaagagg taggcga

<210> SEQ ID NO.: 178

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggttggtg aagaagagg taggcga

.....
.....
.....

.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....

<210> SEQ ID NO.: 179

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actggaagct ggcgggacca cag

<210> SEQ ID NO.: 180

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcactggaag ctgggaccac agg

<210> SEQ ID NO.: 181

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgtggtccc gccagcttcc agt

...

...

...

...

<210> SEQ ID NO.: 182

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cctgtggtcc cagcttccag tgc

<210> SEQ ID NO.: 183

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgggagttc cccagtcagt c

<210> SEQ ID NO.: 184

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgggagttc accagtcagt c

5

3

5

3

<210> SEQ ID NO.: 185

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcgggagtt cccagtcag tcc

<210> SEQ ID NO.: 186

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcgggagtt caccagtcag tcc

<210> SEQ ID NO.: 187

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccccatcggt aagcgcgggc cgg

<210> SEQ ID NO.: 188

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccccatcggt aggcgcgggc cgg

<210> SEQ ID NO.: 189

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggcccgcg cttaccgatg ggg

<210> SEQ ID NO.: 190

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggcccgcg cctaccgatg ggg

<210> SEQ ID NO.: 191

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador.

<400>

gaaaagaggc tggcccaccc ctt

<210> SEQ ID NO.: 192

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaaaagaggc ttctccttgg ccg

<210> SEQ ID NO.: 193

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aaaagaggct ggcccacccc t

<210> SEQ ID NO.: 194

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aaaagaggct tctccttggc c

<210> SEQ ID NO.: 195

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgccttcccg tgctcaccca cagcc

<210> SEQ ID NO.: 196

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgccttcccg tggtcaccca cagcc

<210> SEQ ID NO.: 197

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggctgtgggt gagcacggga aggcg

<210> SEQ ID NO.: 198

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggctgtgggt gaccacggga aggcg

<210> SEQ ID NO.: 199

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actatctcca ccgtggtgag cccag

<210> SEQ ID NO.: 200

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actatctcca ccatggtgag cccag

.....
.....
.....

.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....

<210> SEQ ID NO.: 201

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgggctcac cacggtggag atagt

<210> SEQ ID NO.: 202

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgggctcac catggtggag atagt

<210> SEQ ID NO.: 203

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gggctctgtc cattgtcctc cccat

5

3

3

3

<210> SEQ ID NO.: 204

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gggctctgtc cactgtcctc cccat

<210> SEQ ID NO.: 205

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atggggagga caatggacag agccc

<210> SEQ ID NO.: 206

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atggggagga cagtggacag agccc

...

...

...

...

<210> SEQ ID NO.: 207

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcaacatgg ctagagactg ccggg

<210> SEQ ID NO.: 208

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcaacatgg ctggagactg ccggg

<210> SEQ ID NO.: 209

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcaacatggc tagagactgc cgg

5'

3'

5'

3'

<210> SEQ ID NO.: 210

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcaacatggc tggagactgc cgg

<210> SEQ ID NO.: 211

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgctgatgac ggtgtcatag gaa

<210> SEQ ID NO.: 212

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgctgatgac gatgtcatag gaa

5

3

5

3

<210> SEQ ID NO.: 213

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gctgatgacg gtgtcatagg a

<210> SEQ ID NO.: 214

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gctgatgacg atgtcatagg a

<210> SEQ ID NO.: 215

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tccaaacttc actccatctc aag

5

3

5

3

<210> SEQ ID NO.: 216

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcctaaacttc agtccatctc aag

<210> SEQ ID NO.: 217

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cttgagatgg agtgaagttt gga

<210> SEQ ID NO.: 218

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cttgagatgg actgaagttt gga



<210> SEQ ID NO.: 219

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcccaagtgga ctgcgacaac ggctc

<210> SEQ ID NO.: 220

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcccaagtgga ctacgacaac ggctc

<210> SEQ ID NO.: 221

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gagccgttgt cgcagtccac ttggc

3

3

3

3

<210> SEQ ID NO.: 222

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gagccgttgt cgtagtcac ttggc

<210> SEQ ID NO.: 223

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgctggcca gggacatgag gagct

<210> SEQ ID NO.: 224

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgctggcca ggtacatgag gagct

<210> SEQ ID NO.: 225

<211> 25

<212> polinucleótido

...

...

...

...

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctcctcat gtccctggcc agcag

<210> SEQ ID NO.: 226

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctcctcat gtacctggcc agcag

<210> SEQ ID NO.: 227

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctcgccgcgg cggggactgc aggta

<210> SEQ ID NO.: 228

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

...

...

...

...

ctcgccgcgg cgaggactgc aggta

<211> 25

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> cebador

<400>

tacctgcagt ccccgccgcg gcgag

<211> 25

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> cebador

<400>

tacctgcagt cctcgccgcg gcgag

<211> 25

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> cebador

<400>

gaccatcttg gaggatgaaa agagg

[illegible]

<210> SEQ ID NO.: 232

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaccatcttg gacgatgaaa agagg

<210> SEQ ID NO.: 233

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cctcttttca tcctccaaga tggtc

<210> SEQ ID NO.: 234

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cctcttttca tcgtccaaga tggtc

<210> SEQ ID NO.: 235

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gttttcctcg tcagatttgt ccttgca

<210> SEQ ID NO.: 236

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gttttcctcg tcacatttgt ccttgca

<210> SEQ ID NO.: 237

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ttttcctcgt cagatttgtc cttgc

5'

3'

5'

3'

<210> SEQ ID NO.: 238

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ttttcctcgt cacatttgtc cttgc

<210> SEQ ID NO.: 239

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ttgtccttgc agtcggggcc acta

<210> SEQ ID NO.: 240

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ttgtccttgc agacggggcc accat

...

...

...

...

<210> SEQ ID NO.: 241

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccttgca gtcggggcca cca

<210> SEQ ID NO.: 242

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccttgca gacggggcca cca

<210> SEQ ID NO.: 243

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agcccagtag cgtgagggct ctgtc

...

...

...

...

<210> SEQ ID NO.: 244

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agcccagtag cgagagggct ctgtc

<210> SEQ ID NO.: 245

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacagagccc tcacgctact gggct

<210> SEQ ID NO.: 246

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacagagccc tctcgctact gggct

<210> SEQ ID NO.: 247

<211> 25

5

4

3

2

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcgccttgct cctcgccgcg gcggg

<210> SEQ ID NO.: 248

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcgccttgct ccccgccgcg gcggg

<210> SEQ ID NO.: 249

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccgccgcg cgaggagcaa ggcga

<210> SEQ ID NO.: 250

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccgccgcgg cggggagcaa ggcga

<210> SEQ ID NO.: 251

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acggctacag ctacccctcg gtgag

<210> SEQ ID NO.: 252

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggctacagc taccctcg gtgag

<210> SEQ ID NO.: 253

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctcaccgagg ggtagctgta gccgt

<210> SEQ ID NO.: 254

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctcaccgagg gggtagctgt agccg

<210> SEQ ID NO.: 255

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccaggagac gtgctgtgag tcccc

<210> SEQ ID NO.: 256

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccaggagac gtactgtgag tcccc

<210> SEQ ID NO.: 257

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggggactcac agcacgtctc ctggg

<210> SEQ ID NO.: 258

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggggactcac agtacgtctc ctggg

<210> SEQ ID NO.: 259

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctccccatcg gtaagcgcg ggcgg

<210> SEQ ID NO.: 260

<211> 25

<212> polinucleótido

...

...

...

...

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctcccatcg gtcagcgcg gccgg

<210> SEQ ID NO.: 261

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggcccgcg cttaccgatg gggag

<210> SEQ ID NO.: 262

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggcccgcg ctgaccgatg gggag

<210> SEQ ID NO.: 263

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

5

5

5

5

<221> cebador

<400>

ccagtacatg aagctggtgg gaga

<210> SEQ ID NO.: 264

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcttgatctt ggctgggga cagag

<210> SEQ ID NO.: 265

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cagtacatga agctggtggg agg

<210> SEQ ID NO.: 266

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cttgatcttg gcctggggac aga

